

**EVALUACION DE LA NISINA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EN EL
PROCESO DE ENVASADO DE LECHE UHT**

ANGELINE MONCADA ARMILLA

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS, TECNOLOGIA E INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
CEAD PALMIRA
2 0 0 9**

**EVALUACION DE LA NISINA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EN EL
PROCESO DE ENVASADO DE LECHE UHT**

ANGELINE MONCADA ARMILLA

**Trabajo de grado presentado
Como requisito parcial para
Optar al título de
Ingeniero de Alimentos**

Asesor:

**Ingeniero de Alimentos
NORMAN RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BASICAS, TECNOLOGIA E INGENIERIA
PROGRAMA DE INGENIERIA DE ALIMENTOS
CEAD PALMIRA
2 0 0 9**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Trabajo de Grado aprobado por el Comité del Plan de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD, sede Palmira, válido como requisito parcial para optar al Título de Ingeniero en Alimentos.

Presidente

Asesor

Jurado

Palmira, Enero de 2009

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la fortaleza y guiarme en todas las actividades de mi vida.

Agradezco a mi familia por darme su apoyo y confianza, por sus palabras motivadoras, por toda su entrega.

Agradezco al director de tesis Ingeniero Norman Rodríguez por toda su enseñanza y tiempo que me brindo, también para mis tutores Lizeth León y Armando Campo por guiarme en este paso de mi formación para que culminara exitosamente mi carrera.

Angeline

DEDICATORIA

A Rosita, mi madre, que siempre estuvo a mi lado apoyándome, que siempre se sintió orgullosa de cada escalón que superaba.

Angeline

RESUMEN

El siguiente trabajo estudia los resultados sobre la actividad que tiene la Nisina, bacteriocina de origen natural como barrera antimicrobiana para la conservación de la leche, que es uno de los alimentos fundamentales en la dieta humana y se caracteriza por ser perecedero, es uno de los alimentos más complejos que nos regala la naturaleza porque contiene: Agua, Proteínas, Grasa, Azúcares, Vitaminas, Minerales, Calcio y Fósforo.

Es decir la leche contiene todos los elementos indispensables para crecer y mantener el organismo sano y fuerte.

En los países en vía de desarrollo donde la calidad de ésta materia prima no es la ideal para el procesamiento de leche ultraaltatemperatura (UHT) y donde no existe cadena de refrigeración, es necesario desarrollar formulas para mantener su calidad.

Por tal motivo se desarrolla este trabajo realizando 7 ensayos con diferentes concentraciones de Nisina adicionada durante el proceso de (UHT).

El producto obtenido de cada ensayo fue analizado con pruebas fisicoquímicas y microbiológicas para determinar la concentración de Nisina más apropiada.

Como resultado se logró estandarizar la dosis de Nisina óptima manteniendo su actividad antimicrobiana, la cual fue de 7ppm garantizando la inocuidad del producto durante toda su vida útil y sobre todo que no afecte de ninguna manera el organismo humano.

Con el uso de ésta bacteriocina en el proceso de leche (UHT) no solo se está controlando la supervivencia y posterior desarrollo de microorganismos sino

también se está generando una segunda barrera de protección adicional al empaque, pudiendo así dar mayor garantía de inocuidad en condiciones difíciles de transporte y almacenamiento.

Esta tesis abre un campo de investigación en los temas de tecnología aséptica y de utilización de agentes naturales en la conservación de los productos.

GLOSARIO

- Acidez:** La acidez de una sustancia es el grado en el que es acida. El concepto complementario es la basicidad. La acidez de una sustancia se puede determinar por métodos volumétricos, es decir midiendo los volúmenes. Esta medición se realiza mediante una titulación, la cual implica siempre tres agentes o medios: el titulante, el titulado y el colorante.
- Acido Láctico:** El ácido láctico (Del lat. Lac lactis, leche), también conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxipropanoico o ácido α -hidroxipropanoico, es un compuesto químico que juega importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la fermentación láctica.
- Análisis**
- Organoléptico:** Se realiza para detectar olor, aspecto, color. (Materias extrañas que pueden contener la leche, tales como pelos, pasto, insectos)
- Bacteriocinas:** Un péptido o proteína producido por microorganismos de grado alimenticio como los lácticos con actividad microbiana típicamente, pero no siempre contra cepas de bacterias relacionadas.
- Coliformes:** Designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.

Densidad: (Del lat. Densitas, -atis). F cualidad de denso. II 2. Fís. Magnitud que expresa la relación entre la masa y el volumen de un cuerpo. Su unidad en el sistema internacional es el kilogramo por metro cúbico (kg/m³).

Esporas: Células de microorganismos con vida latente, pero capaz de crecer y reproducirse cuando las circunstancias le son favorables.

Estandarización

de leche: Es el proceso mediante el cual se hacen extracciones parciales de crema y/o caseinatos de la leche, con el objeto de mantener la relación grasa y/o proteína con respecto a la materia seca.

EVOH: Etilenvinilalcohol

GRAS: Generalmente reconocido como segura.

H.T.S.T.: Alta temperatura corto tiempo.

INIA: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.

Inocuidad: La cualidad de que un alimento no cause daño a la salud, se refiere en el caso de los productos agroalimentarios a que ellos no estén asociados a riesgos que puedan afectar la salud de los consumidores, los cuales pueden ser introducidos tanto en el proceso de producción primaria como en los procesos de transformación.

Leche Ultrapasteurizada

(UHT) leche larga vida: Es el producto obtenido mediante proceso térmico en flujo continuo, aplicado a la leche cruda o termizada a una temperatura entre 135°C a 150°C y tiempos entre 2 y 4 segundos, de tal forma que se compruebe la destrucción eficaz de las esporas bacterianas resistentes al calor, seguido inmediatamente de enfriamiento a temperatura ambiente y envasado aséptico en recipientes estériles con barreras a la luz y al oxígeno, cerrados herméticamente, para su posterior almacenamiento, con el fin de que se asegure la esterilidad comercial sin alterar de manera esencial ni su valor nutritivo ni sus características fisicoquímicas y organolépticas, la cual puede ser comercializada a temperatura ambiente.

Mesófilos

Aerobios: Bacterias viables que determinan el grado de exposición del agua a la contaminación por microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 y 37 °C.

ORG: Prueba organoléptica.

Pasteurizar: (Del fr. Pasteuriser). Tr. Elevar la temperatura de un alimento líquido a un nivel inferior al de su punto de ebullición durante un corto tiempo, enfriándolo después rápidamente, con el fin de destruir los microorganismos sin alterar la composición y cualidades del líquido.

pH: (Sigla de potencial de hidrogeno). m. Quím. Índice que expresa el grado de acidez o alcalinidad de una disolución. Entre 0 y 7 la disolución es acida y de 7 a 14, básica.

Preservación de

alimentos: Mantenimiento de las cualidades organolépticas a lo largo de la vida útil.

Prueba de

alcohol (OH): Detectar acidez de la leche, si el numero de gérmenes en la leche es alto, estos consumen la lactosa y la convierten en acido láctico, el que va aumentando a medida que aumenta los gérmenes. Cuando la leche esta muy acida, se corta al adicionar un volumen igual de alcohol, se realiza mezclando en partes iguales alcohol y leche.

Seguridad

Alimentaria: Reducción del riesgo de patógenos a lo largo de la vida útil.

Tecnología de

barreras múltiples: Uso de barreras como el control de la humedad, el pH, la temperatura y los antimicrobianos, para incrementar la vida útil.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	14
1. TÍTULO	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
4.1 Objetivo General	18
4.2 Objetivos Específicos	18
5. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	19
5.1 Limitaciones del Estudio	19
6. JUSTIFICACIÓN	20
7. MARCO TEÓRICO	24
7.1 Materia Prima	24
7.2 Composición de la leche	24
7.2.1 Componentes que influyen en la calidad de la leche	32
7.2.2 Componentes indeseables en la leche	30
7.2.3 Fuentes de contaminación	32
7.2.4 Propiedades físico químicas de la leche	33

	Pág.
7.3 Microorganismos en la leche	34
7.3.1 <i>Microorganismos de importancia en la leche y productos lácteos</i>	36
7.4 Análisis De La Leche	36
7.5 La leche U.H.T	38
7.5.1 <i>Esterilización</i>	39
7.5.2 <i>Envasado aséptico</i>	39
7.5.3 <i>Ventajas de la leche UHT</i>	40
7.6 Diagrama de flujo producción leche ultra pasteurizada	41
7.7 Las Bacteriocinas (Nisina)	42
7.7.1 <i>Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas</i>	43
7.7.2 <i>Características generales de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas</i>	44
7.7.2.1 <i>Características Bioquímicas</i>	44
7.7.2.2 <i>Composición y estructura</i>	45
7.8 La Nisina	46
7.8.1 <i>Estructura</i>	46
7.8.2 <i>Perspectiva histórica</i>	46
7.8.3 <i>Características físicas y químicas</i>	48
7.8.4 <i>Solubilidad y estabilidad</i>	48
7.8.5 <i>Actividad frente a las bacterias Gram-positivas y esporuladas</i>	49
7.8.6 <i>Actividad frente a las bacterias Gram-negativas</i>	49
7.8.7 <i>Modo de acción</i>	50
7.8.8 <i>Producción comercial de la nisina</i>	51
7.8.9 <i>Toxicidad de la nisina</i>	52
7.8.10 <i>Propiedades inmunológicas</i>	52
7.8.11 <i>Aplicaciones en la industria Láctea</i>	53

	Pág.
8. METODOLOGÍA	55
8.1 Recursos	55
8.1.1 <i>Materia Prima</i> . Leche estandarizada	55
8.1.2 <i>Antimicrobiano</i> . Nisina comercial	55
8.1.3 <i>Materiales</i>	55
8.1.4 <i>Reactivos para análisis fisicoquímicos</i>	55
8.1.5 <i>Equipos</i>	55
8.1.6 <i>Unidad Experimental</i> . Leche estandarizada	56
8.2 Metodología Experimental	56
8.2.1 <i>Estandarización de la materia prima (Leche)</i>	56
8.2.2 <i>Pruebas de adición de Nisina</i>	56
9. RESULTADOS	58
9.1 Ensayo #1	58
9.1.1. <i>Estandarización de la Materia Prima</i>	58
9.1.2 <i>Efecto de la Nisina sobre el producto terminado</i>	59
9.1.3 <i>Resultados: 12 horas de Incubación</i>	59
9.1.4 <i>Resultados: 24 horas de incubación</i>	60
9.1.5 <i>Resultados: 48 horas de incubación</i>	61
9.2 Ensayo #2	62
9.2.1 <i>Estandarización de la Materia Prima</i>	62
9.2.2 <i>Efecto de la Nisina sobre el producto terminado</i>	63
9.2.3 <i>Resultados: 12 horas de incubación</i>	63
9.2.4 <i>Resultados: 24 horas de incubación</i>	64
9.2.5 <i>Resultados: 48 horas de incubación</i>	65

	Pág.
CONCLUSIONES	88
RECOMENDACIONES	89
BIBLIOGRAFIA	90
ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estructura de las proteínas	27
Figura 2	Estructura de los triglicéridos	29
Figura 3	Estructura de la Nisina	46
Figura 4	Bacterias Gram + y Gram –	50

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla No. 1 Composición general de la leche	24
Tabla No. 2 Concentraciones minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml)	30
Tabla No. 3 Principales microorganismos que se encuentran en la leche	36
Tabla No. 4 Análisis que se realizan a la leche	37
Tabla No. 5 Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos	56
Tabla No. 6 Pruebas de adición de Nisina	57
Tabla No. 7 Análisis físico químico	58
Tabla No. 8 Análisis microbiológico	58
Tabla No. 9 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	59
Tabla No. 10 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	59
Tabla No. 11 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	60
Tabla No. 12 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	60

	Pág.
Tabla No. 13 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	61
Tabla no. 14 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	61
Tabla No. 15 Análisis físico químico	62
Tabla No. 16 Análisis microbiológico	62
Tabla No. 17 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	63
Tabla No. 18 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	63
Tabla No.19 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	64
Tabla No. 20 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	64
Tabla No. 21 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	65
Tabla No. 22 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	65
Tabla No. 23 Análisis físico químico	66
Tabla No. 24 Análisis microbiológico	66
Tabla No. 25 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	67
Tabla No. 26 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	67

	Pág.
Tabla No. 27 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	68
Tabla No. 28 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	68
Tabla No. 29 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	69
Tabla No. 30 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	69
Tabla No. 31 Análisis físico químico	70
Tabla No. 32 Análisis microbiológico	70
Tabla No. 33 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	71
Tabla No. 34 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	71
Tabla No. 35 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	72
Tabla No. 36 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	72
Tabla No. 37 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	73
Tabla No. 38 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	73
Tabla No. 39 Análisis físico químico	74
Tabla No. 40 Análisis microbiológico	74

	Pág.
Tabla No. 41 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	75
Tabla No. 42 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	76
Tabla No. 43 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	76
Tabla No. 44 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	77
Tabla No. 45 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	77
Tabla No. 46 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	78
Tabla No. 47 Análisis físico químico	78
Tabla No. 48 Análisis microbiológico	79
Tabla No. 49 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	80
Tabla No. 50 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	80
Tabla No. 51 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	81
Tabla No. 52 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	81
Tabla No. 53 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	81
Tabla No. 54 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	82

	Pág.
Tabla No. 55 Análisis físico químico	82
Tabla No. 56 Análisis microbiológico	83
Tabla No. 57 Análisis físico químico a las 12 horas de incubación	83
Tabla No. 58 Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación	84
Tabla No. 59 Análisis físico químico a las 24 horas de incubación	84
Tabla No. 60 Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación	85
Tabla No. 61 Análisis físico químico a las 48 horas de incubación	85
Tabla No. 62 Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación	85

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Grafico No. 1 Relación Concentración de Nisina por ppm Vs. \$ / Lts	86
Grafico No. 2 Efectividad de la Nisina en cada ensayo realizado.	87

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo No. 1 Aspectos Legales	99

INTRODUCCION

La leche es uno de los alimentos fundamentales en la dieta humana y se caracteriza por ser perecedero. Uno de los primeros desarrollos en el tema de protección de la leche para garantizar su inocuidad, es la Pasteurización donde calentando a una temperatura moderada (para evitar cambios en el sabor) se logra la destrucción de los microorganismos patógenos. Posteriormente se utilizan barreras como son el envase y la refrigeración para su conservación.

En los países en vía de desarrollo donde la calidad de la materia prima no es la ideal para el procesamiento de leche ultraaltatemperatura (UHT) y donde no existe cadena de refrigeración, es necesario desarrollar fórmulas y envases flexibles económicamente adecuados para mantener su calidad. El mercado de leche ultraaltatemperatura en envase flexible ha crecido enormemente desplazando el consumo de leche pasteurizada y el uso de métodos de preservación puede contribuir grandemente en el desarrollo del mercado de consumo masivo para los productos UHT mejorando su inocuidad.

Avanzando en el proceso de protección por barreras para la leche ultraaltatemperatura, este trabajo pretende analizar las posibilidades de uso de la nisina, una bacteriocina de origen natural como barrera antimicrobiana para la conservación del producto.

Para el desarrollo de este trabajo se realizaron 7 ensayos con diferentes concentraciones de nisina adicionada durante el proceso de UHT. El producto obtenido de cada ensayo fue analizado con pruebas fisicoquímicas y microbiológicas para determinar la concentración de nisina apropiada. Como resultado se logró estandarizar la dosis de nisina óptima para garantizar la inocuidad del producto terminado.

1. TÍTULO

**EVALUACION DE LA NISINA COMO AGENTE ANTIMICROBIANO EN EL
PROCESO DE ENVASADO DE LECHE UHT**

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia no se tiene una amplia aplicación y manejo de los avances de la tecnología en la producción primaria y en la recolección de leche; es por esto que es difícil obtener los estándares internacionales de calidad para el procesamiento ultra alta temperatura (UHT).

El tratamiento UHT permite reducir sustancialmente el contenido de microorganismos de tal manera que el producto resultante puede denominarse comercialmente estéril, pero existen microorganismos que pueden encontrarse en la materia prima como son las esporas termo resistentes que pueden sobrevivir a este proceso.

Lo anterior puede generar un problema en la industria del envasado, puesto que podrían resultar contaminaciones que en un momento dado pueden afectar la salud pública o que también alteran sus condiciones fisicoquímicas pudiendo también generar pérdidas de producto. La industria requiere dar total garantía de inocuidad a los productos que procese.

Como producto alimenticio la leche debe tener un estricto control durante su procesamiento, envasado, y distribución, en este último paso protegiendo su contenido cuando los efectos del transporte y la mala manipulación causen daño mecánico a la barrera del material del envase.

En Colombia se produce casi 20 millones de litros de leche al día de los cuales solamente se refrigera enseguida del ordeño posiblemente el 10% de éste volumen, esto influye en la calidad del producto y genera la inquietud de como adaptar las condiciones de la leche a los requisitos del proceso UHT para de esta

manera sostener el crecimiento del mercado para los productos lácteos UHT de acuerdo a la demanda actual y las necesidades del consumidor.

3. HIPÓTESIS

Si se añade dentro del proceso UHT de la leche una dosis adecuada de nisina, se puede obtener como resultado una disminución total de la resistencia de los microorganismos, que prevalece en la etapa de envasado logrando, una barrera de protección biológica adicional a la protección del material de envasado.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el uso de la bacteriocina nisina como agente microbiano en el proceso del envasado aséptico de la leche UHT.

4.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensayos de adición de nisina durante la estandarización de la leche para el proceso UHT en planta piloto.
- Realizar análisis fisicoquímicos, microbiológicos y organolépticos en el proceso y producto terminado para confirmar el efecto de la dosis de nisina adicionada en cada ensayo.
- Determinar la dosis eficaz de nisina que permite conservar la inocuidad de la leche UHT como producto terminado.

5. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

El impacto de este proyecto se refleja en los siguientes aspectos:

Representa una importancia tecnológica porque explora nuevas alternativas de tecnologías de barrera y conservación natural.

Se constituye en una herramienta para el aseguramiento de la calidad e inocuidad porque permite lograr la estabilidad del producto mediante el uso de barreras sucesivas.

Permite el desarrollo de mercado de leche UHT como un producto protegido por múltiples barreras que puede llegar a los mercados más alejados ofreciendo total garantía.

La profundización en este tipo de investigaciones y el desarrollo de la viabilidad tecnológica de estos procesos abrirá un campo que hasta ahora no ha sido cubierto por la normatividad vigente.

5.1 Limitaciones del Estudio

Esta investigación se limita a la comprobación de la hipótesis inicial y a la determinación de una dosis tecnológica y económicamente óptima de adición de nisina que garantice la inocuidad de la leche UHT.

6. JUSTIFICACIÓN

La inocuidad de los productos alimenticios es una prioridad para la Ingeniería de Alimentos, pues garantiza no solo seguridad en el consumo de alimentos, sino competitividad en el mercado nacional e internacional.

Una de las alternativas para garantizar la inocuidad alimentaria es la implementación de la nisina que es un agente antimicrobiano natural y puede ser empleada como barrera microbiana en productos lácteos.

La leche es un producto de alto valor nutritivo que contribuye a la buena alimentación tanto de niños, adolescentes y adultos que proporciona nutrientes esenciales tales como proteínas, vitaminas y minerales como el Calcio.

El procesamiento de leche UHT ha avanzado en el diseño de envases que dan una barrera efectiva al oxígeno, al agua, a los aromas y a las contaminaciones cruzadas. Barrera que ya es obligatoria de acuerdo con la ley.

El consumo de leche en Colombia es de 15 millones de litros diarios distribuidos como leches Pasteurizadas, UHT, leche en polvo y productos lácteos, por lo tanto es importante mejorar la estabilidad del producto para obtener mejores posibilidades de distribución.

7. MARCO TEORICO

7.1 Materia Prima

La leche es definida por el Código alimentario como el líquido obtenido en el ordeño higiénico de vacas bien alimentadas y en buen estado sanitario.

La leche es uno de los alimentos mas complejos que nos regala la naturaleza, contiene: Agua, Proteínas, Grasa, Azucares, Vitaminas, Minerales, Calcio y Fósforo.

Es decir la leche contiene todos los elementos indispensables para crecer y mantener el organismo sano y fuerte.

7.2 Composición de la leche

La leche es un sistema coloidal constituido por una solución acuosa de lactosa (5%) sales (0,7%) y muchos otros elementos en estado de disolución, en donde se encuentran las proteínas (3,2%) en estado de suspensión y la materia grasa en estado de emulsión. El extracto seco total de la leche es por término medio del 13,1% y el extracto seco desengrasado del 9,2%

Tabla No. 1 - Composición general de la leche

Componentes Mayoritarios	
Agua	86,9%
Materias grasas	3,9%
Proteínas y sustancias Nitrogenadas no proteicas	3,2%

Carbohidratos	5,1%
Sales	0,9%
Componentes Minoritarios	
Enzimas	
Vitaminas	
Pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina)	
Células diversas (epiteliales, leucocitos, bacterias, levaduras, mohos)	
Otros elementos (dióxido de carbono, oxígeno, nitrógeno y otros gases)	
Sustancias extrañas.	

Fuente: AMIOT, J. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia S.A.

La leche es un producto nutritivo complejo que posee más de 100 sustancias que se encuentran ya sea en solución, suspensión o emulsión en agua. Por ejemplo: Caseína, la principal proteína de la leche, se encuentra dispersa como un gran número de partículas sólidas tan pequeñas que no sedimentan, y permanecen en suspensión. Estas partículas se llaman micelas y la dispersión de las mismas en la leche se llama suspensión coloidal.

La grasa y las vitaminas solubles en grasa en la leche se encuentran en forma de emulsión; esto es una suspensión de pequeños glóbulos líquidos que no se mezclan con el agua de la leche;

La lactosa (azúcar de la leche), algunas proteínas (proteínas séricas), sales minerales y otras sustancias son solubles; esto significa que se encuentran totalmente disueltas en el agua de la leche.

Las micelas de caseína y los glóbulos grasos le dan a la leche la mayoría de sus características físicas, además le dan el sabor y olor a los productos lácteos tales como mantequilla, queso, yoghurt, etc.

La composición de la leche varía considerablemente con la raza de la vaca, el estado de lactancia, alimento, época del año y muchos otros factores. Aún así, algunas de las relaciones entre los componentes son muy estables y pueden ser utilizados para indicar si ha ocurrido alguna adulteración en la composición de la leche. Por ejemplo, la leche con una composición normal posee una gravedad específica que normalmente varía de 1,023 a 1,040 (a 20°C) y un punto de congelamiento que varía de -0,518 a -0,543°C.

Cualquier alteración, por agregado de agua por ejemplo, puede ser fácilmente identificada debido a que estas características de la leche no se encontrarán más en el rango normal.

La leche es un producto altamente perecedero que debe ser enfriado a 4°C lo más rápidamente posible luego de su recolección. Las temperaturas extremas, la acidez (pH) o la contaminación por microorganismos pueden deteriorar su calidad rápidamente.

La dosis diaria recomendada cubierta por un vaso (250 c.c.) de leche ultra pasteurizada: Calcio: 44%; Vitamina A: 20% y Vitamina D: 50%

Proteínas: La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en la forma de proteína (Figura 1). Pág. 25. Los bloques que construyen a todas las proteínas son los aminoácidos. Existen 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas.

El orden de los aminoácidos en una proteína, se determina por el código genético, y le otorga a la proteína una conformación única. Posteriormente, la conformación espacial de la proteína le otorga su función específica.

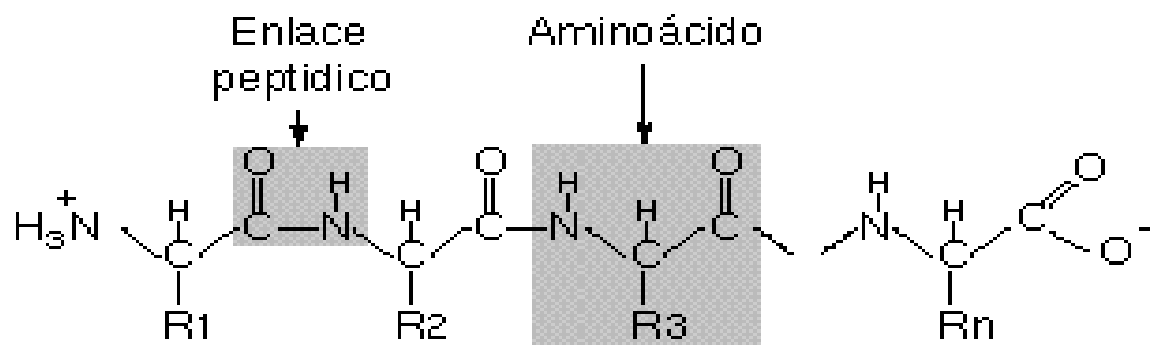


Figura 1 - Estructura de las proteínas

La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0% (30-40 gramos por litro). El porcentaje varía con la raza de la vaca y en relación con la cantidad de grasa en la leche. Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la cantidad de proteína en la leche-cuanto mayor es la cantidad de grasa, mayor es la cantidad de proteína.

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). Históricamente, esta clasificación es debida al proceso de fabricación de queso, que consiste en la separación del cuajo de las proteínas séricas luego de que la leche se ha coagulado bajo la acción de la renina (una enzima digestiva colectada del estómago de los terneros).

El comportamiento de los diferentes tipos de caseína (, y) en la leche al ser tratada con calor, diferente pH (acidez) y diferentes concentraciones de sal, proveen las características de los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas de leche (condensada, en polvo, etc.).

Ocasionalmente, los niños o lactantes son alérgicos a la leche debido a que su cuerpo desarrolla una reacción a las proteínas en la leche. La alergia produce erupciones en la piel, asma y/o desórdenes gastrointestinales (cólicos, diarrea, etc.). En los casos de alergia, la leche de cabra es utilizada generalmente como sustituto; aún así, algunas veces la leche con caseína hidrolizada debe ser utilizada.

Grasa: Normalmente, la grasa (o lípido) constituye desde el 3,5 hasta el 6,0% de la leche, variando entre razas de vacas y con las prácticas de alimentación. Una ración demasiado rica en concentrados que no estimula la rumia en la vaca, puede resultar en una caída en el porcentaje de grasa (2,0 a 2,5%).

La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión.

La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en la forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos (Figura 2). Pág. 30. Las proporciones de ácidos grasos de diferente largo determina el punto de fusión de la grasa y por lo tanto la consistencia a la mantequilla que deriva de ella. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta (cadenas de menos de ocho átomos de carbono) producidas de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación ruminal.

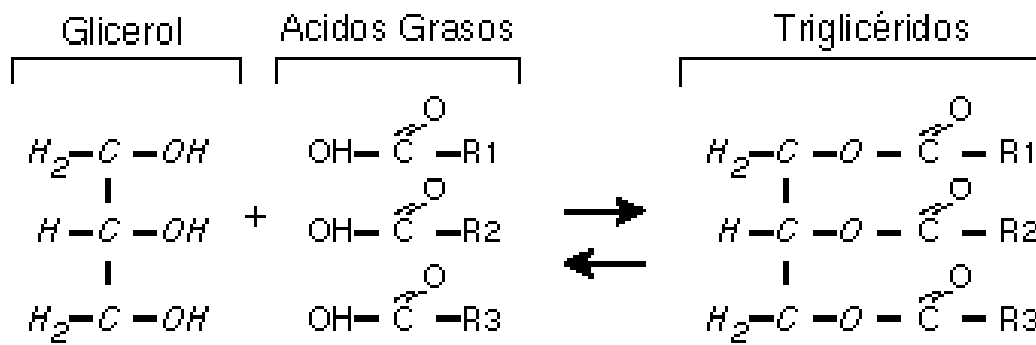


Figura 2: Estructura de los triglicéridos

Esta es una característica única de la grasa de la leche comparada con otras clases de grasas animales y vegetales. Los ácidos grasos de cadena larga en la leche son principalmente los insaturados (deficientes en hidrógeno), siendo los predominantes el oleico (cadena de 18 carbonos), y los polinsaturados linoleico y linolénico.

Minerales y vitaminas:

La leche es una fuente excelente para la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento del lactante. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche.

Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto. Otro mineral de interés en la leche es el hierro.

Las bajas concentraciones de hierro en la leche no alcanzan a satisfacer las necesidades del lactante, pero este bajo nivel pasa a tener un aspecto positivo

debido a que limita el crecimiento bacteriano en la leche--el hierro es esencial para el crecimiento de muchas bacterias.

Tabla No. 2 - Concentraciones minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml)

MINERALES	mg/100 ml	VITAMINAS	ug/100 ml ¹
Potasio	138	Vit. A	30,0
Calcio	125	Vit. D	0,06
Cloro	103	Vit. E	88,0
Fósforo	96	Vit. K	17,0
Sodio	8	Vit. B1	37,0
Azufre	3	Vit. B2	180,0
Magnesio	12	Vit. B6	46,0
Minerales trazas ²	<0,1	Vit. B12	0,42
		Vit. C	1,7

Fuente: Equipo Regional de fomento y capacitación en lechería para América Latina, FAO, Universidad Nacional de Colombia ICTA 1981

¹ ug = 0,001 gramo

² Incluye cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, selenio, iodo y otros.

7.2.1 Componentes que influyen en la calidad de la leche

Enzimas en la leche: Las enzimas, tienen la capacidad de provocar reacciones químicas y de afectar el curso y la velocidad de tales reacciones. Las enzimas llevan a cabo su tarea sin ser consumidas. Por ello son llamadas con frecuencia biocatalizadores. Una enzima, probablemente, toma parte en una reacción, pero es liberada otra vez en cuanto ha terminado su tarea.

La acción de las enzimas es específica, cada tipo de enzima cataliza exclusivamente un tipo de reacción.

Las enzimas presentes en la leche tienen su origen en la ubre de la vaca o en las bacterias. Las primeras se consideran como componentes naturales de la leche enzimas originales. Las otras, llamadas enzimas bacterianas, varían en tipo y abundancia según la naturaleza y de la población bacteriana. Algunas de estas enzimas de la leche son utilizadas en controles de calidad.

Entre las más importantes están la peroxidasa, catalasa, fosfatasa y lipasa.

Peroxidasa: La peroxidasa transfiere oxígeno del peróxido de hidrógeno hacia sustancias oxidables. Esta enzima es inactivada si la leche se calienta a 80°C durante unos cuantos segundos.

Catalasa: La catalasa desdobla el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. Determinando la cantidad de oxígeno que la enzima puede liberar en la leche, es posible estimar su contenido en catalasa y saber si dicha leche proviene de un animal de ubres sanas. La catalasa es inactivada a temperaturas de HTST

Fosfatasa: La fosfatasa tiene la particularidad de desdoblar ciertos ésteres del ácido fosfórico en ácido fosfórico y los correspondientes alcoholes. La presencia de fosfatasas en la leche puede ser detectada por la adición del éster de ácido fosfórico y un reactivo que cambia el color cuando reacciona con el alcohol liberado. Un cambio en el color indica que la leche contiene fosfatasa. Esta enzima es destruida por la Pasteurización HTST, de forma que la prueba de la fosfatasa puede ser utilizada para determinar si se ha alcanzado la temperatura de Pasteurización.

Lipasa: La lipasa desdobla la grasa en glicerol y ácidos grasos libres. El exceso de ácidos grasos en la leche y en los productos lácteos da lugar a un sabor rancio. La acción de esta enzima parece, en la mayoría de los casos, ser muy débil, aunque la leche de algunas vacas muestra una fuerte actividad lipasica. Esta

enzima es, en una gran proporción, inactivada por la pasteurización HTTST, pero se requieren temperaturas superiores para su total inactivación. Muchos microorganismos producen lipasa. Esto puede acarrear problemas serios, ya que esta enzima es muy resistente al calor¹.

7.2.2 Componentes indeseables en la leche. La leche y sus subproductos son alimentos perecederos. Altos estándares de calidad a lo largo de todo el procesamiento de la leche son necesarios para alcanzar o mantener la confianza del consumidor, y para hacer que ellos decidan comprar productos lácteos.

La leche que deja el establecimiento debe de ser de la más alta calidad nutricional-inalterada y sin contaminar. A continuación se presenta una lista parcial de las sustancias indeseables más comunes que se encuentran en la leche:

- Agua adicional
- Detergentes y desinfectantes
- Antibióticos
- Pesticidas o insecticidas
- Bacterias

La vigilancia de los productores en seguir las instrucciones en el uso de productos químicos, como también un buen ordeño, limpieza y almacenamiento de los productos no son solo esenciales para su éxito propio pero también para el éxito de la industria lechera en general.

7.2.3 Fuentes de contaminación². Los microorganismos pueden encontrarse en todo lugar: en los animales, en la gente, en el aire, en la tierra, en el agua y en la

¹ Curso de Laboratorio – Centro de Entrenamiento Tetrapack, México 1991

² Lácteos – monografías.com.htm

leche. Una leche de buena calidad, segura para consumo humano, es el resultado de reconocidas prácticas sanitarias observadas a lo largo de todas las etapas del proceso, desde la extracción de la leche hasta su envasado.

El número de bacterias presentes en el producto final refleja las condiciones sanitarias bajo las cuales la leche ha sido procesada y permite determinar el periodo de preservación de ésta o de sus derivados. Las principales fuentes de contaminación en la leche cruda por presencia de microorganismos están constituidas por superficies tales como las ubres del animal y los utensilios.

Durante el manipuleo, las manos también portan bacterias a la leche. Por ello, resulta sumamente importante lavar cuidadosamente las manos y las superficies con agua limpia. Las mejoras en las prácticas sanitarias durante el manipuleo y el procesamiento tradicional de la leche pueden no ser bien recibidas debido a las creencias culturales o, simplemente, a la falta de tiempo. Se requiere desarrollar talleres de capacitación para demostrar en la práctica el efecto de las buenas técnicas sanitarias en la calidad del producto final.

7.2.4 Propiedades físico químicas de la leche³. Los componentes de la leche se encuentran en diferentes formas físicas. El estado físico depende principalmente del grado de dispersión.

Las soluciones verdaderas son las que están constituidas por sustancias en estado ionizado o por moléculas individuales dispersas en un solvente.

Estas partículas tienen un diámetro inferior a 1nm y pueden atravesar las membranas semi-permeables (ultrafiltración). Las fuerzas de afinidad entre las partículas y el solvente son suficientes para mantener la dispersión. La lactosa y

³ AMIOT, J. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia S.A.

las sustancias salinas solubles se encuentran en la leche en solución verdadera. Las soluciones coloidales las constituyen sustancias en forma de partículas de tamaño superior a 1nm. Estas sustancias pueden ser grandes moléculas individuales o agregados de moléculas que no pueden atravesar las membranas semi-permeables. La estabilidad de las soluciones coloidales depende principalmente de las cargas eléctricas de la superficie de las partículas y en ocasiones también del agua de hidratación. Las cargas eléctricas superficiales les impiden coalescer. Frecuentemente, la neutralización de estas cargas es suficiente para que la solución pierda bruscamente su estabilidad. En este tipo de solución se encuentran las albúminas, las globulinas, la caseína soluble y los fosfatos coloidales.

7.3 Microorganismos en la leche⁴

La leche es un buen medio para el crecimiento de microorganismos por su alto contenido en agua, su pH y la gran variedad de nutrientes que posee. A su paso por la ubre, por contacto con el pezón, la piel del animal y el equipo de ordeño, así como durante el almacenamiento y transporte, va adquiriendo una microbiota entre la que se incluyen microorganismos beneficiosos, (por ejemplo, bacterias lácticas), algunos son alterantes y otros son perjudiciales para la salud.

La recogida, almacenamiento y transporte de la leche son operaciones que deben realizarse con la máxima higiene posible para conseguir una leche cruda de gran calidad microbiológica. Es necesario que llegue a la industria en el tiempo más corto y a la temperatura de refrigeración más baja posible (máximo a 4°C).

A pesar de las mejoras en los procesos tecnológicos y de la implantación de procedimientos de control como el APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de

⁴ www.monografias.com/trabajo6/lacte/lacte.shtml

Control Crítico) en la industria alimentaria, el número de toxiinfecciones asociadas al consumo de alimentos continúa aumentando, incluso en los países más desarrollados. La leche y los productos lácteos son responsables de un considerable porcentaje de brotes producidos por bacterias patógenas en países industrializados. Los factores que contribuyen al desarrollo de brotes transmitidos por alimentos dependen en gran medida del microorganismo causante. Diversos estudios epidemiológicos llevados a cabo en EE.UU, concluyeron que los factores más frecuentemente relacionados con el desarrollo de enfermedades de origen alimentario fueron, en este orden, temperaturas de mantenimiento y almacenamiento inadecuadas, inapropiada higiene personal del manipulador de alimentos, tratamientos térmicos insuficientes y equipos contaminados.

Las tres bacterias patógenas que tradicionalmente han preocupado en mayor medida a los microbiólogos de alimentos son: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* y *Clostridium botulinum*. Sin embargo, en los últimos años diversos microorganismos han ganado una gran importancia como agentes causantes de toxiinfecciones alimentarias. Entre estos microorganismos denominados patógenos "emergentes" se incluyen *Listeria monocytogenes*, *Bacillus Céreus*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* verotoxigénico (ECVT).

7.3.1 Microorganismos de importancia en la leche y productos lácteos

Tabla No. 3 - Principales microorganismos que se encuentran en la leche

BACTERIAS GRAM +	REPERCUSION
BACTERIAS LÁCTICAS - Lactococcus - Lactobacillus - Streptococcus	Acidificación, coagulación, proteolisis
MICROCOCOS	Forman parte de la flora inocua que contamina la leche (después del ordeño)
ESTAFILOCOCOS - Staphylococcus pyogenes - S. aureus - S. albus	Intoxicaciones en humanos Transtornos gastrointestinales
BACTERIAS ESPORULADAS	Acidificación, coagulación, proteolisis son responsables de las alteraciones en leches calentadas
BACTERIAS GRAM –	REPERCUSION
ENTEROBACTERIAS - Escherichia coli - Cloaca - Klebsiella - Citrobacter	Son huéspedes normales del intestino de los mamíferos contaminación de origen fecal. Habitad: agua y suelo Enfermedades infecciosas (Salmonellas)

Fuente: www.monografías.com/trabajo6/lacte/lacte.shtml

7.4 Análisis De La Leche

La calidad de la leche puede ser valorada de forma aproximada por diversos métodos. Muchos de los análisis utilizados ponen en evidencia el crecimiento excesivo de las bacterias detectando las alteraciones de las propiedades o de la composición que producen en la leche. La acidez titulable y los indicadores de pH son dos ejemplos de ello.

En el momento de la recogida de la leche se efectúa la prueba de alcohol, con un reactivo compuesto por un indicador y alcohol. La leche se mezcla con 5ml de reactivo y si es normal da un color rojo cereza, mientras que si es anormalmente ácida tomará un color naranja. Cuando una muestra coagula por acción del alcohol, quiere decir que es una leche anormal por la presencia de calostro, leche mamética, leche del final de lactación de muchas vacas del rebaño, o incluso a que se hayan producido fermentaciones importantes.

Un programa de control de calidad debe también incluir ocasionalmente la prueba de lacto filtración o de sedimentación, que permite detectar la presencia de sólidos extraños y demostrar al productor en que medida está limpia la leche.

En la tabla No. 4 se presentan los análisis que se realizan a la leche.

Tabla No. 4 – Análisis que se realizan a la leche

REQUISITOS	MÍNIMO	MÁXIMO
Densidad a 15° C (Gravedad específica)	1.0300	1.0330
Materia Grasa % m/m	3.0	-
Sólidos Totales % m/m	11.3	-
Sólidos no grasos % m/m	8.3	-
Acidez expresada como ácido láctico % (m/v)	0.13	0.16
PH	6.6	6.7
Impureza macroscópica (sedimentos) (mg/500 cm ³ norma o disco)	-	4.0
Índice crioscópico	-0.530 °C	-0.510 °C
(para recibos individuales por fincas)	(-0.550) °H	(-0.530) °H
Índice de refracción	nD ₂₀ 1.3420	-
Índice lactométrico	8.4 °L	-
Prueba de alcohol	No se coagulará por la adición de un volumen igual de alcohol de 68 % en peso o 75 % en volumen.	
Presencia de conservantes	Negativa	
Presencia de adulterantes	Negativa	
Presencia de neutralizantes	Negativa	

Fuente: Pérez Gavilán Escalante.1993.

7.5 La leche U.H.T⁵

El tratamiento de la leche a ultra-alta-temperatura (UHT) se conoce desde hace más de un siglo; ya en 1893 se construyeron equipos que podían tratar la leche a 125°C durante 6 minutos. En 1909, se fabricó un sistema tubular de funcionamiento continuo, capaz de calentar la leche a 130° - 140°C. Sin embargo, hasta 1951 no fue posible el envasado aséptico por el procedimiento Martín Canning y diez años más tarde (1961), la compañía sueca Tetra-Pak, comercializó la primera envasadora aséptica. A partir de ese momento, se despertó un gran interés por la leche UHT, que tuvo una gran expansión en el continente europeo, antes de introducirse comercialmente en Canadá, en la ciudad de Québec en 1975.

El tratamiento UHT consiste en el calentamiento de la leche en continuo a una temperatura mínima de 132°C durante algunos segundos, su refrigeración a temperatura ambiente y su envasado aséptico. Los fines que persigue son los siguientes:

1. Asegurar su estabilidad y su larga conservación para satisfacer las exigencias comerciales.
2. Eliminar los microorganismos patógenos que puedan alterar la salud del consumidor y sus toxinas.
3. Destruir todos los microorganismos capaces de proliferar durante el almacenamiento.

⁵ AMIOT, J. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia S.A.

La elaboración de la leche UHT, comprende dos fases: la esterilización y el envasado aséptico.

7.5.1 Esterilización. El tratamiento térmico se aplica de dos maneras: el tratamiento directo, que consiste en la inyección de vapor en la leche (uperizacion) o la dispersión de la leche en una cámara de vapor: tanto en un caso como en el otro, el diagrama del tratamiento será el mismo y el tratamiento indirecto, que se suministra en un sistema tubular o la combinación de ambos, también en este caso el diagrama es mas o menos igual, utilizando el mismo principio de regeneración que el de la leche pasteurizada.

7.5.2 Envasado aséptico. Una vez esterilizada, la leche debe mantenerse en un estado de asepsia total: el sistema de tratamiento puede conectarse directamente a una o más envasadoras, o bien a un tanque de almacenamiento aséptico, el tanque aséptico sirve para almacenar la leche hasta su distribución en los envases. Antes de la llegada de la leche, el tanque se esteriliza y las válvulas de regulación se protegen con barreras de vapor que las mantienen estériles. Cuando la leche sale del tanque hacia la envasadora aséptica, el volumen que queda se sustituye por aire estéril filtrado.

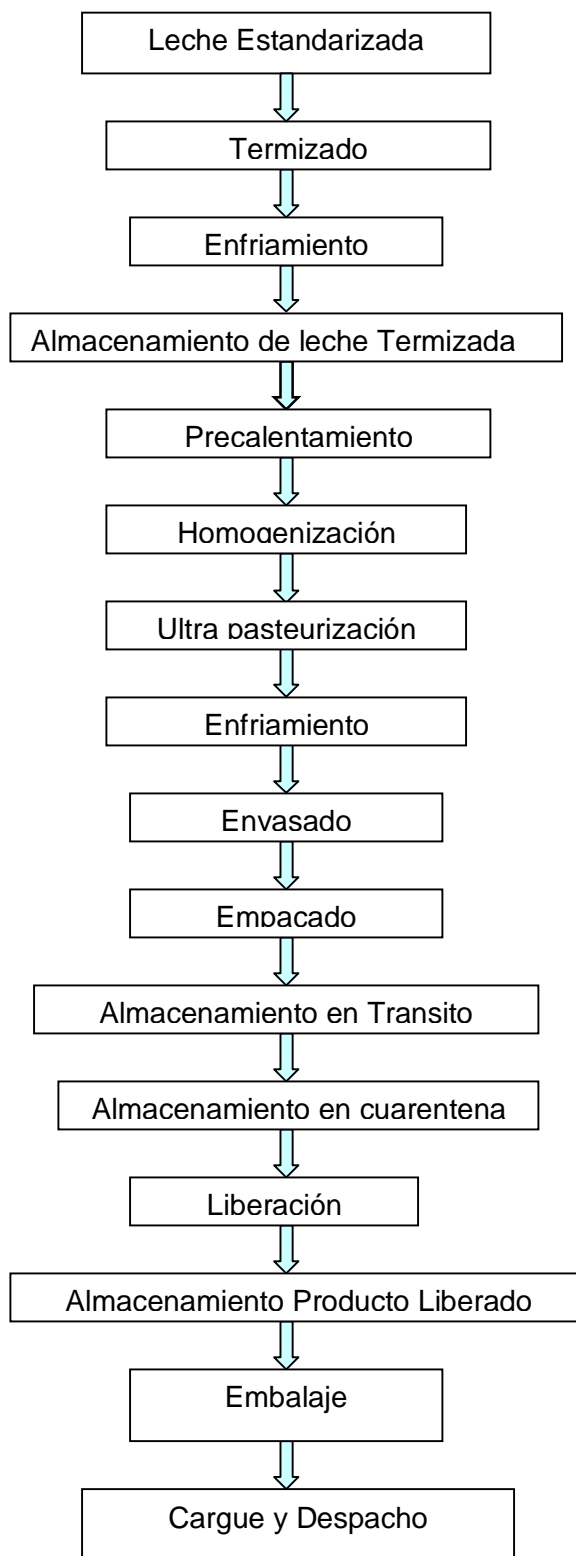
La envasadora aséptica tiene que asegurar la esterilización del envase y disponer de una zona estéril para el llenado. Generalmente el envase se esteriliza con peroxido de hidrogeno a una concentración del 30-35%, que seguidamente se evapora a una temperatura superior a 100°C, necesaria para la esterilización del papel.

En los sistemas más sencillos, el material de envasado se compone de polietileno, aluminio y papel laminado. Este tipo de material protege adecuadamente al producto frente a la luz y el aire.

El envasado aséptico es la operación más delicada de todo el proceso UHT, tanto desde el punto de vista del control como por las medidas preventivas que requiere. El funcionamiento de la envasadora exige personal muy bien entrenado tanto para llevar a cabo las operaciones necesarias como para el mantenimiento del equipo.

7.5.3 Ventajas de la leche UHT. El tratamiento UHT, se considera como la revolución más importante en tecnología lechera desde la Pasterización H.T.S.T. Este procedimiento ofrece la doble ventaja de una larga conservación de la leche de consumo sin necesidad de refrigeración. De esta forma, la distribución resulta mas económica porque se puede llevar a cabo, por ejemplo, semanalmente y sin limite de recorrido. Debido a su larga conservación, las devoluciones son muy escasas y se producen principalmente por la incorrecta manipulación del producto. La elaboración de leche esterilizada UHT permite una gran automatización. En este sentido, es importante que el equipo utilizado en este proceso disponga de un sistema automático de limpieza y desinfección (CIP, Clearing in Place).

7.6 Diagrama de flujo producción leche ultra pasteurizada



7.7 Las Bacteriocinas (Nisina)

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente por las bacterias productoras (Sahl y Bierbaum, 1998). Las colicinas de *E. coli* fueron las primeras bacteriocinas descritas (Gratia, 1925). Las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas fueron inicialmente descritas por Rogers (1928) al observar la actividad antimicrobiana de *Lc. lactis* frente a *Lb. bulgaricus* debida a un compuesto proteico y termoestable. Posteriormente, Hirsch (1951) sugirió el empleo de cultivos iniciadores productores de nisina para prevenir la formación de gas por *Clostridium* en queso. Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan un gran interés para la industria alimentaria por su potencialidad para inhibir a microorganismos patógenos y alterantes de alimentos (Yang y Ray, 1994).

Las bacteriocinas pueden estar codificadas en el cromosoma (Holck *et al.*, 1994; Aymerich *et al.*, 1996; Altena *et al.*, 2000) o en plásmidos (Klaenhammer, 1993; Quadri *et al.*, 1994; Kanatani *et al.*, 1995). Incluso en algunos casos los genes pueden estar repartidos entre el cromosoma y plásmidos (Quadri *et al.*, 1994; Venema *et al.*, 1996a, b). Una misma bacteriocina puede ser producida por cepas pertenecientes a géneros distintos, como la pediocina AcH o PA 1.0 producida por *P. acidilactici* H y PAC-1.0 y por *Lb. plantarum* WHE 92 (Ennahar *et al.*, 1996). Una misma cepa puede contener varios plásmidos que codifiquen distintas bacteriocinas (Quadri *et al.*, 1994) y un único microorganismo puede producir más de una bacteriocina, como se ha observado en *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (Van Belkum *et al.*, 1991; 1992). La función de las bacteriocinas (Nes *et al.*, 1996) sería la de capacitar a las bacterias productoras para sobrevivir frente a sus competidores. Se ha observado que algunas actúan como péptidos señal o feromonas para la expresión de genes.

Los determinantes genéticos asociados a la producción de bacteriocinas biológicamente activas se suelen encontrar en operones que incluyen el gen

estructural que codifica la prebacteriocina, el gen de inmunidad, los de procesamiento y transporte, y, en algunos casos, los necesarios para las modificaciones post-traduccionales (Cintas *et al.*, 2001). Estos genes pueden estar organizados en uno (pediocina A) o más operones (lactococina A)

El uso de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores o fermentos lácticos ha despertado un interés considerable tanto por parte de los investigadores como de la industria. La nisina es la bacteriocina más estudiada y ha sido reconocida como sustancia segura (GRAS) por la FDA (Ronk, 1988). Se emplea como conservante en más de 50 países, en quesos fundidos, conservas vegetales, huevo pasteurizado, productos de pastelería y bebidas alcohólicas.

7.7.1 Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas. Las cepas citadas a continuación pertenecen a las colecciones de cultivos del Departamento de Tecnología de Alimentos del INIA.

- *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* TAB 24, productor de lacticina 481
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 26, productor de nisina Z
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* TAB 50, productor de nisina A
- *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis TAB 57, productor de la bacteriocina no caracterizada TAB 57
- *Enterococcus faecium* TAB 7, productor de la bacteriocina no caracterizada TAB 7
- *Ec. faecalis* TAB 52, productor de enterocina I

- *Ec. faecalis* TAB 70, productor de enterocina AS-48
- *Ec. faecalis* INIA 4, productor de enterocina AS-4

El objetivo de la bioconservación es extender la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos utilizando una microbiota natural o controlada y/o sus productos (Stiles, 1996). Puede abordarse inoculando las cepas bacterianas que crecerán y producirán sustancias antagonistas, o bien añadiendo el producto de la fermentación de un microorganismo o dichas sustancias concentradas y/o purificadas. Estos sistemas de bioconservación no pueden sustituir las buenas prácticas de elaboración, pero ofrecen un parámetro adicional de procesado para mejorar la seguridad y asegurar la calidad de los alimentos.

En la actualidad se considera a las bacterias lácticas microorganismos GRAS (Generally Recognized As Safe) por lo que su utilización y/o la de sus metabolitos como bioconservantes está recibiendo una gran atención (Gould, 1996; Stiles, 1996). Los principales mecanismos de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas son la competencia por nutrientes y la formación de ácido láctico y acético, con el consiguiente descenso del pH (Kandler, 1983; Daeschel, 1989; Lindgren y Dobrogosz, 1990). Además, pueden producir otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno, ácido benzoico, isómeros de aminoácidos, reuterina y bacteriocinas (Piard y Desmazeaud, 1991; Requena y Peláez, 1995).

7.7.2 Características generales de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas

7.7.2.1 Características Bioquímicas. La tolerancia al calor es generalmente alta, pudiendo resistir tratamientos equivalentes al de pasteurización, aunque en algunos casos, como la diplococcina (Davey y Richardson, 1981) o la lactacina B

(Barefoot y Klaenhammer, 1984), su resistencia se reduce significativamente tras su purificación. Ésta termo resistencia sugiere una organización molecular carente de estructura terciaria (Piard y Desmazeaud, 1992), existiendo algunas excepciones como en la helveticina J cuya estabilidad térmica es más baja, debido a una estructura proteica más compleja (Joerger y Klaenhammer 1986).

La adaptación a las condiciones medioambientales debidas a la bacteria productora, justifican su tolerancia a un pH neutro y acido en algunos casos, como en la nisina, su actividad antimicrobiana aumenta a un pH por debajo de la neutralidad y la termo estabilidad es mayor a pH acido. Por otra parte, la mayoría de las bacteriocinas son estables durante su almacenamiento a temperaturas de -20°C o inferiores

Estas propiedades fisicoquímicas hacen ideal el empleo de las bacteriocinas en la industria alimentaria, puesto que podrían resistir los tratamientos térmicos y los cambios de pH que sufren muchos alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño podría favorecer su difusión homogénea dentro de ellos (Piard y Desmazeaud, 1992)

7.7.2.2 Composición y estructura. El análisis comparativo de la composición y estructura de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, muestra una amplia heterogeneidad química entre estas sustancias. La mayoría son péptidos o proteínas que pueden contener aminoácidos modificados y, a veces, un componente lipidito o glucídico (Piard y Desmazeaud, 1992).

Algunas de ellas son glucoproteínas, como la lactocina 27 o la carnocina LA44A o lipoproteínas como la dextranina 24 y la mesenterocina 52, mientras que en otros casos se trata de complejos glucolipoproteicos, como la fermenticina y la plantaricina S, si bien en algunos casos estas observaciones podrían ser debidas a purificaciones no totalmente homogéneas (Suriana y Klaenhammer 1991). La

composición aminoacídica y la estructura, son dos de los factores considerados en la clasificación de las bacteriocinas.

7.8 La Nisina

7.8.1 Estructura

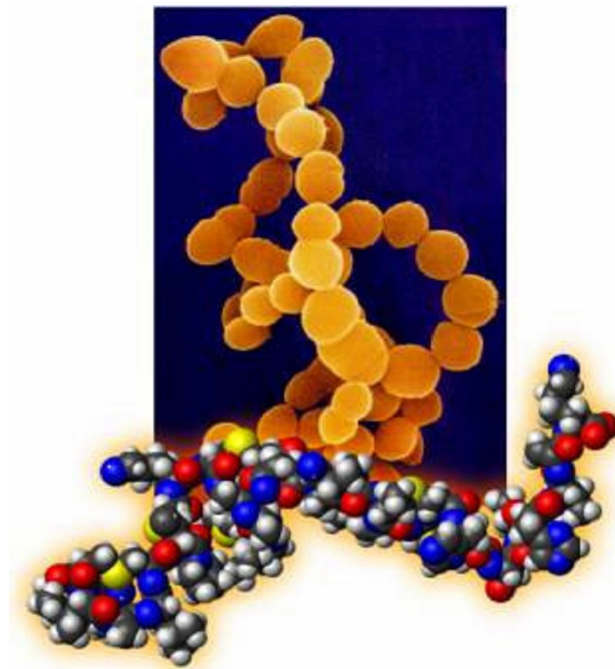


Figura No. 3 - Estructura de la Nisina

7.8.2 Perspectiva histórica. En los años 50 comenzó el interés por ese compuesto y ello condujo a la determinación de su secuencia aminoacídica (Gross y Morell, 1971), síntesis química (Fukase y col, 1988) determinación de su conformación (Jung, 1991) y la localización y secuenciación del gen estructural y de los adyacentes involucrados en su producción (Buchman et al, 1988 Kaletta y Entian, 1989, Dodd et al, 1990, Oteen y Col, 1991), así como la determinación de su ausencia de toxicidad en los animales (Frazer et al, 1962).

La ausencia de toxicidad de la nisina, su inactivación por la α -quimotripsina (Jarvis y Mahoney, 1969), su termoestabilidad a pH ácido (Liu y Hansen, 1990) y su presencia natural en algunos sustratos alimenticios como la leche y los productos lácteos (Chevalier et al, 1957), vegetales (Harris et al, 1992, Uhlman et al, 1992) y productos cárnicos (Rodríguez et al 1995), ha propiciado la generación de su uso como agente antimicrobiano en la industria alimentaria. La primera preparación comercial de la nisina se obtuvo en Inglaterra en 1953 y en 1968 una comisión conjunta de la FAO/WHO aceptó su empleo como conservante alimentario, indicando que la dosis aceptable podría ser superior a los 0.825 mg/Kg. (FAO/WHO, 1969). En 1983 se añadió a la lista positiva de aditivos de la CEE con el número E234 (CEE, 1983) y la FDA le confirió el estatus de sustancia GRAS (Generally Regarded As Safe), para su empleo en la elaboración de quesos fundidos pasteurizados (Registro Federal, 1988). Actualmente se emplea en más de 50 países, aunque con distintos criterios en cuanto a los límites máximos de utilización permitidos y de alimentos donde se puede emplear (Vandenbergh, 1993). La utilización de la nisina como conservante alimentario comenzó en los quesos para evitar la germinación de los esporos de *Clostridium botulinum* y de otros esporulados alterantes, posteriormente, su empleo se ha extendido para prolongar la vida útil de diversos productos lácteos pasteurizados, evitar la alteración de las conservas por microorganismos termófilos, en productos de panadería, productos de humedad elevada, huevo líquido pasteurizado, control de la alteración de bebidas alcohólicas fermentadas por bacterias lácticas y en la conservación de alimentos de pH ácido.

Actualmente se pretende potenciar su actividad con agentes quelantes o con otras bacteriocinas y emplearlo como adyuvante en las nuevas técnicas de procesado y conservación de los alimentos, como el empleo de presiones elevadas (Ultrahigh Hydrostatic Pressure, o UHP) o de campos eléctricos pulsantes (Pulsed Electrical Field, o PEF). Además, la obtención de preparaciones muy purificadas de la nisina y la potenciación de su actividad con quelantes, ha abierto nuevas perspectivas en

cuanto a su utilización como agente terapéutico en la prevención y el tratamiento de la úlcera péptica en el hombre y en el control de mastitis en los animales (Delves-Broughton et al, 1996). Actualmente, también se estudia su posible utilización como antiséptico en pastas dentífricas y en cremas cutáneas.

7.8.3 Características físicas y químicas. La nisina es un antibiótico de 34 aminoácidos de los cuales varios están modificados post-traduccionalmente, originando la deshidroalanina.

Es un agente antimicrobiano natural que consiste en varios polipéptidos estrechamente relacionados, producidos por cepas naturales de *Streptococcus lactis* del grupo N de Lancefield, cepa que se encuentra de forma natural en la leche.

7.8.4 Solubilidad y estabilidad. La nisina tiene una carga neta positiva de +3 (+2 en el caso de la nisina Z), debido a su elevada proporción de aminoácidos básicos (Harris et al, 1992), de ahí que su punto isoeléctrico sea alcalino (Jung 1991). Además, esta molécula es insoluble en solventes apolares y soluble en medios acuosos, su solubilidad es altamente dependiente del pH de la solución y, así se reduce considerable y constantemente al aumentar el pH (Hirsch, 1951, Liu y Hansen, 1990). La solubilidad disminuye de 57 mg/ml a pH 2 a 1,5 mg/ml a pH 6 y 0.25 mg/ml a pH 8.5 (Liu y Hansen, 1990). A pH alto, llega incluso a inactivarse y a pH 11 la actividad se destruye completamente a 63°C en 30 minutos. Este efecto parece ser el resultado de modificaciones químicas tanto intra- como intermoleculares, ya que los residuos de deshidroalanina (DHA) y deshidrobutirina (DHB) son fácilmente atacados por radicales nucleofílicos presentes en los medios a pH alcalino. Al haber tres residuos de este tipo por molécula, las reacciones intermoleculares pueden dar lugar a agregados insolubles de gran tamaño.

La estabilidad también depende de la composición química de la solución, del tratamiento térmico aplicado, de la presencia de otros componentes del alimento, etc. Se ha determinado que la presencia de proteínas de gran tamaño en los alimentos incrementa su estabilidad a los tratamientos térmicos (Hall, 1966, Delves-Broughton y Williams, 1993). Los preparados comerciales de nisina, no muestran pérdidas de actividad durante un periodo de dos años siempre que se mantengan almacenados en lugares secos, oscuros y a una temperatura inferior a los 25°C. Aunque la nisina pura puede mantenerse estable por mucho tiempo, cuando se añade a los alimentos su estabilidad disminuye y así se ha observado que en el queso fundido pasteurizado se reduce un 15% a 85-95°C en 15 minutos, o un 55-70% durante 6 meses a 30°C (Delves-Broughton, 1990).

7.8.5 Actividad frente a las bacterias Gram-positivas y esporuladas. La nisina inhibe a la mayoría de las bacterias Gram-positivas, muchas de ellas alterantes de los alimentos o responsables de intoxicaciones o toxiinfecciones alimentarias (Ray, 1992), aunque la sensibilidad es muy variable entre especies y cepas. En el caso de los microorganismos formadores de esporos, la nisina inhibe tanto a la célula vegetativa como al esporo. Dentro del mismo género, algunas de las especies o de las cepas pueden ser resistentes, si bien la frecuencia de aparición de resistencias es también variable. Así mismo, dentro de los microorganismos sensibles, la sensibilidad relativa varía mucho dependiendo de la especie y cepa. Así por ejemplo, en el caso de *Staphylococcus aureus*, algunas cepas fueron sensibles a 4 UI/ml de nisina, mientras que otras requirieron 128 UI/ml, mientras *Staphylococcus aureus* 196, una cepa enterotoxigenica es incluso mas resistente y requiere $7,2 \times 10^3$ UI/ml para reducir las unidades formadoras de colonias (UFC) en cinco unidades logarítmicas (Jones, 1974).

7.8.6 Actividad frente a las bacterias Gram-negativas. La nisina es ineficaz frente a las bacterias Gram-negativas, a excepción de algunas cepas de *Neisseria* (Mattick y Hirsch, 1947). Sin embargo, se ha observado que puede tener un efecto

antimicrobiano en estos microorganismos bajo determinadas condiciones como la congelación, el calentamiento o el descenso del pH. Parece que este efecto se debe a las lesiones subletales provocadas en la pared celular, concretamente en los lipopolisacaridos (Ray, 1992), permitiendo el contacto de la nisina con la membrana citoplasmática, sobre la que ejerce su mecanismo de acción (Gao et al, 1991). También se ha observado este efecto en presencia de la nisina con agentes quelantes como el EDTA (Kordel y Sahl, 1986, Stevens et al, 1991, Stevens et al, 1992, Ray, 1992). En este caso, el efecto se debe a que estas sustancias eliminan los iones Mg^{2+} y Ca^{2+} de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, lo que a su vez permite la liberación de fosfolípidos y lipoproteínas. La pérdida de estas sustancias incrementa la permeabilidad de la pared celular, favoreciendo la acción de la nisina en la membrana citoplasmática (Delves-Broughton, 1996).

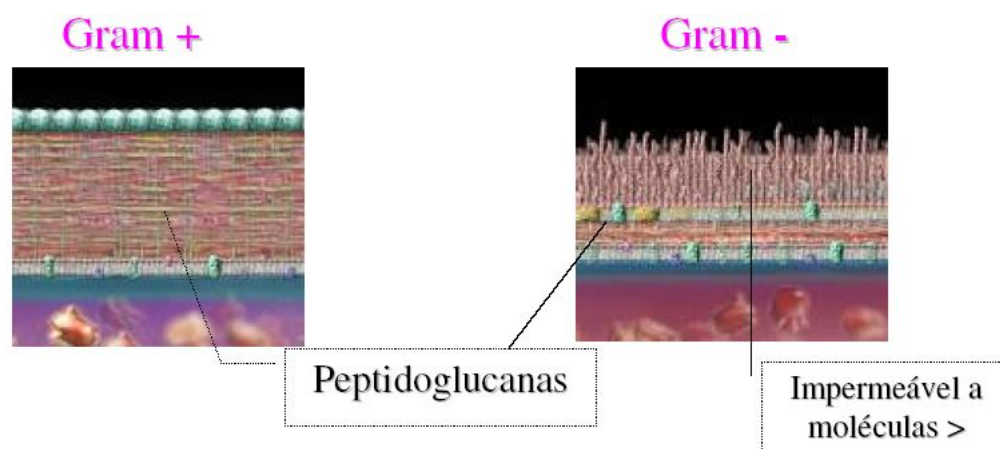


Figura No. 4 – Bacterias Gram + y Gram –

7.8.7 Modo de acción. La nisina manifiesta, al menos, cuatro tipos de actividad antimicrobiana, siendo las dos primeras las de mayor relevancia.

1. Actividad bactericida en las células vegetativas, mediante la formación de poros en la membrana plasmática.

2. Actividad en las esporas bacterianas sensibles, inhibiendo su germinación.
3. Actividad inhibidora de la síntesis de la pared celular.
4. Actividad frente a enzimas autolíticos de las células sensibles.

7.8.8 Producción comercial de la nisina. La nisina se obtiene comercialmente desde 1950, mediante fermentación microbiana con el pH controlado, a partir de leche completa, desnatada, reconstituida (Hawley y Hall, 1957) o de leche tratada con papaina, pepsina o tripsina para hidrolizar parte de sus proteínas (Hall, 1963). Para evitar la contaminación por levaduras, clostridios o bacteriófagos, debe utilizarse un medio estéril y la producción y liofilización deben realizarse en una planta estéril.

Actualmente la nisina disponible en el mercado adopta el nombre comercial de Nisaplin, y produce y comercializa por Aplin & Barret Ltd. Nisaplin es esencialmente el producto desecado y estabilizado de un cultivo de *L. lactis* Subs. *lactis* productor de nisina, que contiene proteínas desnaturalizadas de la leche, cloruro sódico y una actividad estandarizada de 1×10^6 UI/g (Hawley y Hall, 1957).

La nisina también se ha producido comercialmente en Polonia (Nizpol) y en la antigua Rusia (Niros) (Gudkov et al, 1973b). En la patente de Aplin & Barret Ltd. (Hawley y Hall, 1957) la nisina se recupera por la técnica descrita por Hirsch (1951) y la concentración requerida se consigue precipitándola con sales, redisolviéndola y volviéndola a precipitar y desecando el concentrado final. En el producto ruso, la nisina se recupera mediante extracción con ácido aséptico (Egerov et al, 1979) y el empleo de adsorbentes (Baranova y Egorov, 1981).

7.8.9 Toxicidad de la nisina. El hecho de que los microorganismos productores y seguramente la nisina se encuentren de forma natural en diversos sustratos alimenticios como la leche y productos lácteos (Chevalier et al, 1957), vegetales (Harris et al, 1992^a, Uhlman et al, 1992) y productos cárnicos (Rodríguez et al, 1995) y que, por lo tanto, se haya ingerido por animales y personas durante décadas sin ningún efecto adverso aparente, es al menos indicativo de la poca o nula toxicidad de la nisina (Frazer et al, 1962). Además, la inactivación de la nisina por los enzimas del tracto gastrointestinal (Heinemann y Williams, 1966, Jarvis y Mahoney, 1969), garantiza un efecto inocuo en la flora intestinal (Barber et al, 1952).

Además, la nisina no manifiesta resistencia cruzada con los antibióticos que se emplean en terapia humana (Hirsch, 1951, 1954, Lipinska, 1977) y tampoco se han observado efectos de sensibilización en seres humanos (Lipinska, 1977). La dosis letal 50(LD50) es similar a la de la sal común, es decir, unos 7g por Kg. de peso corporal (Hara et al, 1962).

En 1969 el Comité de Expertos sobre Aditivos en los Alimentos de la FAO/WHO (Food Agriculture Organization/ World Health Organization), revisando los estudios realizados sobre la toxicidad de la nisina, recomendó su aceptación como aditivo (WHO, 1969), con una dosis diaria aceptable (ADI) de 0.825 mg por Kg de peso y día.

Actualmente, su utilización esta permitida en mas de 50 países y adopta el numero E234 en la lista de aditivos de la Unión Europea.

7.8.10 Propiedades inmunológicas. A nivel toxicológico, la nisina empleada en los alimentos no manifiesta actividad biológica en los seres humanos (Lipinska, 1977) y debido a su pequeño tamaño molecular, puede considerarse como un hapteno, es decir una molécula que por si misma es incapaz de originar una

respuesta inmune. Para obtener este efecto, es necesario conjugarla a otra molécula que le confiera el tamaño adecuado, denominada molécula vehiculadota o portadora. No obstante, experimentalmente es conveniente generar anticuerpos frente a la nisina con el fin de desarrollar métodos inmunológicos de detección rápida de la misma en los sobrenadantes de los microorganismos productores o en los alimentos, así como de fijar los anticuerpos en columnas que permitan su purificación en un solo paso por cromatografía de inmunoafinidad.

7.8.11 Aplicaciones en la industria Láctea. La primera utilización practica de la nisina en los alimentos, fue como conservante en algunos tipos de quesos y esta aplicación continúa siendo hoy en día una de las más relevantes (McClintock et al, 1952, Delves-Broughton, 1990). En los ingredientes que se emplean en la fabricación del queso fundido, es fácil encontrar esporos de especies de *Clostridium* que resisten el tratamiento térmico de 85-105°C durante 6-10 minutos, que se utiliza durante el procesado para fundir los ingredientes. Las condiciones del queso procesado, especialmente su elevado pH y humedad, junto con el bajo potencial de oxidorreducción (condiciones anaerobias) favorecen la germinación de los esporos y el crecimiento de las células vegetativas, ocasionando la alteración del producto mediante la producción de gas, olores desagradables y licuefacción del queso. Las especies generalmente implicadas son *Clostridium butyricum*, *Clostridium tirobutyricum* y *Clostridium sporogenes*. No obstante, dicho crecimiento puede evitarse añadiendo nisina en la mezcla de componentes, puesto que esta inhibiría la germinación de los esporos. Se ha determinado que 6.25 ug de nisina por gramo de mezcla inhiben una carga de hasta 200 esporos por gramo (Delves-Broughton et al, 1996).

En los quesos fundidos también es preocupante la posible producción de toxinas por las cepas de *Clostridium botulinum*, potencialmente presentes en estos productos. La nisina retarda o evita el desarrollo de los esporos y la formación de toxinas botulínicas, como se ha determinado en muestras de queso fundido

inoculadas con *C. botulinum* de los tipos A y B (Somers y Taylor, 1987). La cantidad de nisina necesaria para conseguir el efecto deseado depende de factores como la carga inicial de esporos en la muestra, el contenido en humedad, el pH, el contenido de sal, el empleo de otros aditivos, el tratamiento térmico, la temperatura de almacenamiento y su vida útil (Delves-Broughton et al, 1996). Las concentraciones empleadas para evitar la alteración varían de 5 a 20 ug/g, mientras que los niveles necesarios para proteger frente a *C. botulinum* son de 12.5 ug/g o mayores. La nisina utilizada procede del preparado comercial de Nisaplin (que contiene un 2% de nisina pura), añadiéndolo directamente en polvo a la mezcla de queso o en suspensión acuosa si el agua forma parte de la formulación. La adición de nisina permite reducir la cantidad de sal e incrementa ligeramente la humedad de la mezcla, lo que mejora su untabilidad (Somers y Taylor, 1987)

Aunque Hirsch et al, (1951), demostraron la capacidad de la nisina para inhibir el desarrollo de los clostridios alterantes del queso de Gruyere, su utilización practica se ve limitada al inhibir también a los cultivos iniciadores que producen las características propias del queso. No obstante, esto podría evitarse empleando cultivos iniciadores resistentes a la nisina o transformados con la información genética de protección e inmunidad frente a este lantibiotico. Esto último se ha realizado en la obtención del queso Gouda, empleando una cepa proteolítica de *Lactococcus lactis* Subs.cremoris y otra cepa de *Lactococcus lactis* Subs.lactis var. Diacetylactis, fermentadora del citrato. En aquellos países tropicales y subtropicales donde la temperatura ambiental es elevada y los sistemas de transporte y refrigeración inadecuados, la nisina puede emplearse en la leche pasteurizada a niveles de entre 0.625 y 1.25 ug/ml para prolongar su vida útil. También se utiliza en la conservación de leches pasteurizadas con sabores (en las chocolateadas, el cacao puede ser otra fuente de esporos), leche evaporada, leche esterilizada y en los postres lácteos a concentraciones de 2.5 a 3.75 ug/ml.

8. METODOLOGÍA

Este trabajo se realizó en una planta de lácteos ubicada en el Valle del Cauca.

8.1 Recursos

8.1.1 Materia Prima. Leche estandarizada

8.1.2 Antimicrobiano. Nisina comercial

8.1.3 Materiales

- a. Bureta de 10ml
- b. Vasos plásticos con capacidad de 200ml
- c. Pipeta volumétrica de 9ml
- d. Pipetas graduadas
- e. Materiales y medios para análisis estándar en microbiología (petrifilm)
- f. Laminado con barrera de EVOH

8.1.4 Reactivos para análisis fisicoquímicos. (Solución de fenolftaleína al 2%, solución de hidróxido de sodio 0.1N, alcohol industrial a 82%).

8.1.5 Equipos

- a. Esterilizador Finnah calentamiento indirecto. 4000 litros/hora.
- b. Envasadora aséptica Asepak AS6
- c. pH metro
- d. Balanza electrónica
- e. Microscopio
- f. Termo lactodensímetro

- g. Horno (esterilizar material)
- h. Ekomilk

8.1.6 Unidad Experimental. Leche estandarizada.

8.2 Metodología Experimental

8.2.1 Estandarización de la materia prima (Leche). La materia prima proviene de Pasto y los hatos del Valle, cada una de las muestras fueron llevadas al laboratorio para hacerles los análisis fisicoquímicos y microbiológicos presentados en la tabla No.5

Tabla No. 5 - Análisis Fisicoquímicos y Microbiológicos

ANALISIS FISICOQUIMICOS	ANALISIS MICROBIOLOGICOS
• Prueba de acidez	• Coliformes Totales
• Prueba de alcohol	• Mesófilos Aerobios
• Prueba Organoléptica	• Esporas Totales
• Ph	• Esporas Termorresistentes
• Densidad	
• % Grasa	

Una vez realizados los análisis se realizó una mezcla de todas las procedencias que cumplieron con los estándares de calidad. La mezcla se almacenó durante un tiempo de 2 horas antes de iniciar con el envasado, en un tanque de acero inoxidable con agitación.

8.2.2 Pruebas de adición de Nisina Se probaron 7 concentraciones las cuales fueron realizadas en ensayos diarios que se resumen en la tabla No. 6

Tabla No. 6 - Pruebas de adición de Nisina

ENSAYO	DOSIS DE NISINA (ppm)	VOLUMEN DE LECHE
1	150	4.000Litros
2	5.64	19.500Litros
3	10	19.500Litros
4	9	19.500Litros
5	8	19.500Litros
6	7	19.500Litros
7	6	19.500Litros

Una vez adicionada la nisina se agitó por 10 minutos (Tanque con cisterna de agitación en acero inoxidable).

Se esterilizó, proceso térmico en flujo continuo aplicado a la leche a una temperatura de 138°C, durante un tiempo de 2 a 4 segundos y luego enfriada a 28°C

Se envasó por una maquina aséptica Asepak AS6 y se empacó en bolsas de polietileno en diferentes presentaciones 1.1ml, 900ml, 600ml, 240ml.

Al finalizar el envasado se tomaron muestras y se realizaron las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas (ver tabla 1) para determinar la calidad del producto final. Dichas pruebas se realizaron en el ensayo a las 0, 12, 24 y 48 horas de incubación a una temperatura de 33°C con base en los resultados obtenidos se determinó la dosis de Nisina apropiada para garantizar la vida útil del producto envasado.

9. RESULTADOS

9.1 Ensayo #1

9.1.1. Estandarización de la Materia Prima: Se tomaron muestras de 6 procedencias, cuatro de ellas fueron de hatos del Valle y dos de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 7 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipitación proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66- 6.80	DENSIDAD Termolact odensímetro 1030-1033	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PASTO	08:30	0.14	- 82	LD	6.73	1.0299	3.54
HATOS DEL VALLE	11:30	0.13.5	- 80	A	6.67	1.0304	3.23
SALIDA DE PASTEURIZADOR	17:30	0.135	- 82	A	6.70	1.0304	3.20

Tabla No. 8 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	93×10^1	5
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	92×10^1	18
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	21×10^2	30	< 1

Los análisis fisicoquímicos nos muestran que la materia prima es apta para el proceso UHT ya que cumple con los parámetros de calidad.

A pesar de que los resultados microbiológicos presentan recuentos altos en la materia prima el proceso de termización hace una buena reducción de carga microbiológica, sin embargo después del tratamiento térmico sobrevivieron mesófilos y esporas totales, para su control se utilizó la adición de nisina a 150ppm.

9.1.2 Efecto de la Nisina sobre el producto terminado. Las siguientes tablas muestran los resultados microbiológicos y fisicoquímicos obtenidos del producto terminado después del tratamiento con nisina a 150ppm. Se muestran las pruebas a 12, 24 y 48 horas de incubación.

9.1.3 Resultados: 12 horas de Incubación

Tabla No. 9 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 1.1 ml	10:30	0.14	- 82	A	6.58	1.030	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 600 ml	10:30	0.14	- 82	A	6.59	1.030	3.28

Tabla No. 10 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 1.1 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los análisis fisicoquímicos a las 12 horas de incubación con una temperatura de 33°C no presentan cambios respecto de la muestra de leche estandarizada.

Los resultados microbiológicos no permiten detectar la presencia de los microorganismos indicadores por lo cual se puede inferir que la combinación del tratamiento y la adición de 150ppm de nisina son efectivas para causar la muerte térmica de las esporas.

9.1.4 Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No. 11 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:18710/07)	Muestra 1.1 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.60	1.030	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:18710/07)	Muestra 600 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.60	1.030	3.28

Tabla No. 12 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 1.1 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los análisis fisicoquímicos a las 24 y 48 horas de incubación con una temperatura de 33°C siguen sin presentar cambios respecto de la muestra de leche estandarizada.

En los resultados microbiológicos no hay presencia de los microorganismos indicadores a las 24 y 48 horas de incubación.

9.1.5 Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 13 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipit ación proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:18710/07)	Muestra 1.1 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.60	1.030	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:18710/07)	Muestra 600 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.60	1.030	3.28

Tabla no. 14 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 1.1 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 18710/07)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los resultados microbiológicos no permiten detectar la presencia de los microorganismos indicadores por lo cual se puede inferir que la combinación del tratamiento y la adición de 150ppm de nisina es efectiva para causar la muerte

térmica de las esporas, estableciendo que logró un umbral alto, se probó una concentración mas baja para llegar a una dosis optima.

9.2 Ensayo #2

9.2.1 Estandarización de la Materia Prima. Se tomaron muestras de 10 procedencias, cuatro de ellas fueron de hatos del Valle y seis de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 15 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipitaci ón proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 1030-1033	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PASTO	09:30	0.14	- 82	LD	6.70	1.030	3.54
HATOS DEL VALLE	13:30	0.14	- 82	A	6.67	1.0305	3.4
SALIDA DE PASTEURIZADOR	16:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0304	3.3

Tabla No. 16 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	95×10^1	5
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	90×10^1	19
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	20×10^2	33	< 1

Los análisis fisicoquímicos de la materia prima para el segundo ensayo muestran que cumple con los parámetros de calidad para el proceso.

Una vez más, los recuentos microbiológicos fueron altos, incluso después de la Pasteurización por la cual se probó una dosis de nisina mucho mas baja, la cual fue de 5.64ppm

9.2.2 Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Ensayo #2

Las siguientes tablas muestran los resultados de la adición de nisina a 5.64ppm

9.2.3 Resultados: 12 horas de incubación

Tabla No. 17 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:28701/08)	Muestra 600 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.67	1.030	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:28701/08)	Muestra 240 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.67	1.0302	3.28

Tabla No. 18 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 28701/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	12 UFC	88 X 10 ¹	15
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 28701/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	7 UFC	83 X 10 ¹	3

Los análisis fisicoquímicos a las 12, 24 y 48 horas de incubación con una temperatura de 33°C no presentan cambios, sigue cumpliendo con sus parámetros de calidad.

A ésta dosis se observó crecimiento de mesófilos y esporas, aunque no hubo presencia de coliformes. Este crecimiento de microorganismos indica que la dosis de nisina y el tratamiento térmico no fue efectiva para eliminar en su totalidad las esporas.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

9.2.4 Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No.19 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:28701/08)	Muestra 600 ml	09:30	0.14	- 82	A	6.60	1.030	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:28701/08)	Muestra 240 ml	09:30	0.14	- 82	A	6.60	1.0302	3.28

Tabla No. 20 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 28701/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	$>300 \times 10^3$	92×10^1	18
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 28701/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	$>300 \times 10^3$	86×10^1	5

Confirmando los resultados microbiológicos de las 12 y 24 horas en coliformes totales siguen siendo no detectables, pero los recuentos en mesófilos son muy altos y en esporas sigue su crecimiento.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

9.2.5 Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 21 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:28701/08)	Muestra 600 ml	10:15	0.14	- 82	A	6.60	1.030	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:28701/08)	Muestra 240 ml	10:15	0.14	- 82	A	6.60	1.0302	3.28

Tabla No. 22 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 28701/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	$>300 \times 10^3$	94×10^1	19
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 28701/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	$>300 \times 10^3$	89×10^1	6

Los resultados microbiológicos a las 48 horas se continuó evidenciando el crecimiento de mesófilos y esporas, razón por la cual se inició un proceso de búsqueda de una dosis óptima, que se mostrará en la tabla siguiente.

Ensayo #3

Estandarización de la Materia Prima

Se tomaron muestras de 9 procedencias, seis de ellas fueron de hatos del Valle y tres de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 23 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ	OH	ORG	pH	DENSIDAD	GRASA
		TITULACION % A. Láctico	Precipitación proteína	Degustación		Termolacto densímetro	Ekomilk V. Mínimo 3.0
		0.13 -0.15	-80 -82		6.66-6.80	1030-1033	
PASTO	09:50	0.14	- 82	LD	6.70	1.030	3.54
HATOS DEL VALLE	12:30	0.14	- 82	A	6.67	1.0305	3.3
SALIDA DE PASTEURIZADOR	14:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.3

Tabla No. 24 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES	MESÓFILOS AEROBIOS	ESPORAS TOTALES (80°C)	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C)
	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	93×10^1	5
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	93×10^1	17
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	25×10^2	40	1

Los análisis fisicoquímicos muestran que es apta para el proceso UHT ya que cumple con los parámetros de calidad.

Los análisis microbiológicos muestran crecimiento microbiano, razón por la cual se empleó una adición de nisina a 10ppm

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Ensayo #3

Las siguientes tablas muestran los resultados de la adición de nisina a 10ppm.

Resultados: 12 horas de incubación

Tabla No. 25 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína -80 -82	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 900 ml	10:30	0.14	- 82	A	6.67	1.0298	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 600 ml	10:30	0.14	- 82	A	6.67	1.0298	3.2

Tabla No. 26 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los análisis fisicoquímicos a las 12 horas de incubación no presentan cambios respecto de la muestra de leche en el inicio del proceso.

Los resultados microbiológicos no permitieron detectar la presencia de los microorganismos.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No. 27 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:20702/08)	Muestra 900 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V:20702/08)	Muestra 600 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.2

Tabla No. 28 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Sus análisis fisicoquímicos a las 24 y 48 horas de incubación con una temperatura de 33°C no presentaron cambios respecto de la muestra de leche estandarizada.

Los resultados microbiológicos nos muestran que permanece sin detectar la presencia de los microorganismos indicadores.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 29 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ	OH	ORG	pH	DENSIDAD	GRASA
			TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	Precipita ción proteína	Degustación	6.66-6.80	Termolacto densímetro 10295-1030	Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:20702/08)	Muestra 900 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V:20702/08)	Muestra 600 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.2

Tabla No. 30 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES	MESOFILOS AEROBIOS	ESPORAS TOTALES (80°C)	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C)
		Recuento Petrifilm Menor de 1	Recuento Petrifilm 1000-10000	Recuento Petrifilm Menor de 1	Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 20702/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los resultados microbiológicos nos mostraron que a esta dosis los recuentos son no detectables.

Se redujo la dosis hasta llegar a una concentración de 6ppm para evaluar cual dosis es la más eficaz.

Ensayo #4

Estandarización de la Materia Prima

Se tomaron muestras de 7 procedencias, cinco de ellas fueron de hatos de Valle y dos de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 31 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PASTO	08:30	0.14	- 82	A	6.70	1.030	3.54
HATOS DEL VALLE	14:00	0.13.5	- 82	A	6.67	1.0305	3.3
SALIDA DE PASTEURIZADOR	17:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0304	3.3

Tabla No. 32 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	95×10^1	19
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	90×10^1	5
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	20×10^2	32	< 1

Los análisis fisicoquímicos son aptos para el proceso.

Los análisis microbiológicos presentan recuentos altos por lo cual se adicionó 9ppm de nisina que se muestra en las siguientes tablas.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Ensayo #4

Las siguientes tablas muestran los resultados de la adición de nisina a 9ppm

Resultados: 12 horas de incubación

Tabla No. 33 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 1.1 ml	08:00	0.14	- 82	A	6.67	1.030	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 240 ml	08:00	0.14	- 82	A	6.67	1.030	3.2

Tabla No. 34 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 1.1 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los análisis fisicoquímicos a las 12 horas de incubación no presentan cambios respecto de la muestra de leche estandarizada.

Los resultados microbiológicos a esta dosis no permiten detectar la presencia de los microorganismos.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No. 35 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipitación proteína	ORG Degusta ción	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:27702/08)	Muestra 1.1 ml	08:45	0.14	- 82	A	6.66	1.030	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V:27702/08)	Muestra 240 ml	08:45	0.14	- 82	A	6.66	1.030	3.2

Tabla No. 36 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 1.1 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Confirmamos en los análisis fisicoquímicos a las 24 y 48 horas de incubación con una temperatura de 33°C que no se presentan cambios en su calidad.

Los resultados microbiológicos nos muestran que permanece sin detectar la presencia de los microorganismos.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 37 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ	OH	ORG	pH	DENSIDAD	GRASA
			TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	Precipita ción proteína	Degustación	6.66-6.80	Termolacto densimetro 10295-1030	Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:27702/08)	Muestra 1.1 ml	09:40	0.14	- 82	A	6.66	1.030	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V:27702/08)	Muestra 240 ml	09:40	0.14	- 82	A	6.66	1.030	3.2

Tabla No. 38 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES	MESÓFILOS AEROBIOS	ESPORAS TOTALES (80°C)	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C)
		Recuento Petrifilm Menor de 1	Recuento Petrifilm 1000-10000	Recuento Petrifilm Menor de 1	Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 1.1 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 27702/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los resultados microbiológicos de las 12, 24 y 48 horas de incubación nos mostraron que a esta dosis de nisina los recuentos son no detectables y sigue siendo efectiva.

Ensayo #5

Estandarización de la Materia Prima

Se tomaron muestras de 6 procedencias, tres de ellas fueron de hatos del Valle y tres de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 39 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipitación proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PASTO	07:30	0.145	- 82	A	6.70	1.0295	3.5
HATOS DEL VALLE	11:00	0.13.5	- 82	A	6.73	1.030	3.4
SALIDA DE PASTEURIZADOR	12:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28

Tabla No. 40 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	94×10^1	6
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	92×10^1	19
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	23×10^2	38	1

Sus análisis fisicoquímicos nos muestran que cumple con los parámetros de calidad de acuerdo con la materia prima seleccionada.

Los análisis microbiológicos tienen recuentos altos, debido a que sobrevivieron mesófilos y esporas totales en el tratamiento térmico se empleó una adición de nisina a 8ppm.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Ensayo #5

Las siguientes tablas muestran los resultados de la adición de nisina a 8ppm

Resultados: 12 horas de incubación

Tabla No. 41 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 900 ml	08:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 240 ml	08:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28

Tabla No. 42 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los análisis fisicoquímicos a las 12, 24 y 48 horas de incubación con una temperatura de 33°C no presentan cambios, continúan cumpliendo con sus parámetros de calidad.

Los resultados microbiológicos a las 12 horas de incubación no permiten detectar la presencia de los microorganismos indicadores, esto indica que la combinación del tratamiento térmico y la adición de 8ppm de nisina son efectivas para causar la muerte térmica de las esporas.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No. 43 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:16703/08)	Muestra 900 ml	09:30	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:16703/08)	Muestra 240 ml	09:30	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28

Tabla No. 44 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los resultados microbiológicos nos muestran que permanece sin detectar la presencia de los microorganismos indicadores.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 45 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk V. Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:16703/08)	Muestra 900 ml	10:50	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28
PRODUCTO TERMINADO (F.V:16703/08)	Muestra 240 ml	10:40	0.14	- 82	A	6.70	1.0298	3.28

Tabla No. 46 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 16703/08)	Muestra 240 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los resultados microbiológicos nos mostró que a esta dosis de nisina los recuentos son no detectables sigue siendo efectiva para todas las muestras incubadas a diferentes horas.

Ensayo #6

Estandarización de la Materia Prima

Se tomaron muestras de 5 procedencias, tres de ellas fueron de hatos del Valle y dos de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 47 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk Mínimo 3.0
PASTO	0800	0.145	- 82	LD	6.70	1.0305	3.4
HATOS DEL VALLE	12:30	0.145	- 82	A	6.73	1.0302	3.5
SALIDA DE PASTEURIZADOR	14:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2

Tabla No. 48 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	92×10^1	4
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	93×10^1	18
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	27×10^2	41	< 1

Los análisis fisicoquímicos cumplen con los parámetros de calidad.

Los análisis microbiológicos presenta recuentos altos a pesar de la termización debido a ello se empleó nisina a 7ppm.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Ensayo #6

Las siguientes tablas muestran los resultados de la adición de nisina a 7ppm

Resultados: 12 horas de incubación

Tabla No. 49 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23703/08)	Muestra 900 ml	08:50	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23703/08)	Muestra 600l	08:50	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2

Tabla No. 50 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23/03/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23/03/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Con esta dosis sus análisis fisicoquímicos a las 12, 24 y 48 horas de incubación con una temperatura de 33°C sigue sin presentar cambios.

Los resultados microbiológicos no permiten detectar la presencia de los microorganismos. Lo cual nos indica que la adición de nisina a 7ppm es efectiva.

Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No. 51 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:23703/08)	Muestra 900 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V:23703/08)	Muestra 600 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2

Tabla No. 52 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23/03/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23/03/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 53 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:23703/08)	Muestra 900 ml	10:30	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2
PRODUCTO TERMINADO (F.V:23703/08)	Muestra 600 ml	10:30	0.14	- 82	A	6.70	1.0302	3.2

Tabla No. 54 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES	MESÓFILOS AEROBIOS	ESPORAS TOTALES (80°C)	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C)
		Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm
		Menor de 1	1000-10000	Menor de 1	Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23/03/08)	Muestra 900 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 23/03/08)	Muestra 600 ml	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE	NO DETECTABLE

Los resultados microbiológicos muestran que a esta dosis de nisina los recuentos son no detectables, por lo tanto dicha dosis sigue siendo efectiva para todas las muestras incubadas. Es la más óptima ya que es una dosis mas baja y no presenta ningún crecimiento microbiano para todas sus siembras de 12 – 24 y 48 horas de incubación.

Ensayo #7

Estandarización de la Materia Prima

Se tomaron muestras de 7 procedencias, cuatro de ellas fueron de hatos del Valle y tres de Pasto, cuyos resultados de calidad fueron:

Tabla No. 55 - Análisis físico químico

MUESTRA DE ORIGEN	HORA	ACIDEZ	OH	ORG	pH	DENSIDAD	GRASA
		TITULACION % A. Láctico	Precipita ción proteína	Degustación		Termolacto densimetro	Ekomilk
		0.13 -0.15			6.66-6.80	1030-1033	Mínimo 3.0
PASTO	09:00	0.14	- 82	LD	6.67	1.0298	3.5
HATOS DEL VALLE	13:00	0.13	- 82	A	6.70	1.030	3.4
SALIDA DE PASTEURIZADOR	16:00	0.14	- 82	A	6.67	1.030	3.3

Tabla No. 56 - Análisis microbiológico

MUESTRA DE ORIGEN	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm
PASTO	$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	93×10^1	5
HATOS DEL VALLE	1×10^3	$>300 \times 10^3$	90×10^1	16
SALIDA DE PASTEURIZADOR	< 1	24×10^2	37	< 1

Los análisis fisicoquímicos de acuerdo con la materia prima son aptos para el proceso, ya que cumple con los parámetros de calidad.

Los análisis microbiológicos presentan carga microbiana alta, por lo cual se empleó una adición de nisina a 6ppm.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Ensayo #7

Las siguientes tablas muestran los resultados de la adición de nisina a 6ppm

Resultados: 12 horas de incubación

Tabla No. 57 - Análisis físico químico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densímetro 10295-1030	GRASA Ekomilk Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 900 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.67	1.0298	3.3
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 240 ml	09:00	0.14	- 82	A	6.67	1.0298	3.3

Tabla No. 58 - Análisis microbiológico a las 12 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES Recuento Petrifilm Menor de 1	MESÓFILOS AEROBIOS Recuento Petrifilm 1000-10000	ESPORAS TOTALES (80°C) Recuento Petrifilm Menor de 1	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C) Recuento Petrifilm Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 900 ml		>300 X 10 ³	>300 X 10 ³	
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 240 ml		>300 X 10 ³	>300 X 10 ³	

A ésta dosis más baja sus análisis fisicoquímicos a las 12, 24 y 48 horas de incubación no hay manifestación de ningún cambio en la calidad.

A la dosis de 6ppm, se observó un alto crecimiento de mesófilos y esporas totales a las 12 horas de incubación. Esto indica que el crecimiento continuará a las 24 y 48 horas, razón por la cual esta dosis ya no es efectiva como se observa en las siguientes tablas.

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 24 horas de incubación

Tabla No. 59 - Análisis físico químico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ TITULACION % A. Láctico 0.13 -0.15	OH Precipita ción proteína	ORG Degustación ón	pH 6.66-6.80	DENSIDAD Termolacto densimetro 10295-1030	GRASA Ekomilk Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:05/04/08)	Muestra 900 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.3
PRODUCTO TERMINADO (F.V:05/04/08)	Muestra 240 ml	10:00	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.3

Tabla No. 60 - Análisis microbiológico a las 24 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES	MESÓFILOS AEROBIOS	ESPORAS TOTALES (80°C)	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C)
		Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm
		Menor de 1	1000-10000	Menor de 1	Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 900 ml		$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 240 ml		$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	

Efecto de la Nisina sobre el producto terminado

Resultados: 48 horas de incubación

Tabla No. 61 - Análisis físico químico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	HORA	ACIDEZ	OH	ORG	pH	DENSIDAD Termolacto densimetro	GRASA Ekomilk
			TITULACION % A. Láctico	Precipita ción proteína	Degustación			
			0.13 -0.15			6.66-6.80	10295-1030	Mínimo 3.0
PRODUCTO TERMINADO (F.V:05/04/08)	Muestra 900 ml	11:50	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.3
PRODUCTO TERMINADO (F.V:05/04/08)	Muestra 240 ml	11:50	0.14	- 82	A	6.66	1.0298	3.3

Tabla No. 62 - Análisis microbiológico a las 48 horas de incubación

MUESTRA	PRESENTACION	COLIFORMES TOTALES	MESÓFILOS AEROBIOS	ESPORAS TOTALES (80°C)	ESPORAS TERMORRESISTENTES (98°C)
		Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm	Recuento Petrifilm
		Menor de 1	1000-10000	Menor de 1	Menor de 1
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 900 ml		$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	
PRODUCTO TERMINADO (F.V: 05/04/08)	Muestra 240 ml		$>300 \times 10^3$	$>300 \times 10^3$	

IMPACTO ECONOMICO DE LA DOSIS DE NISINA ÓPTIMA

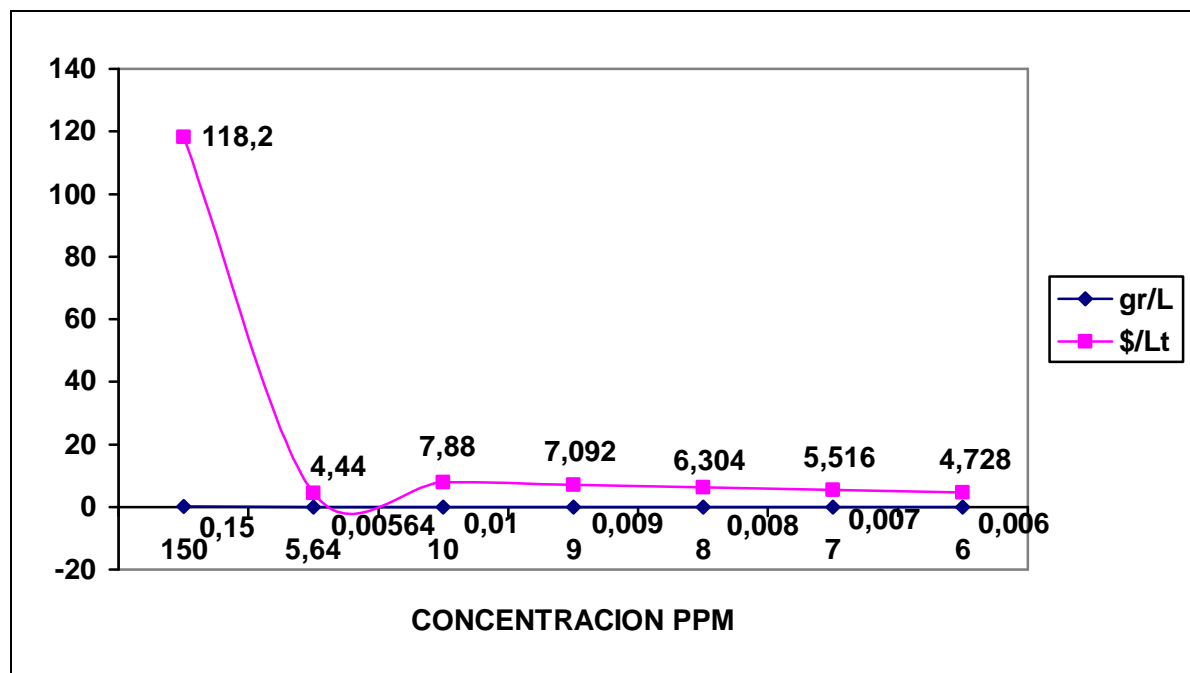


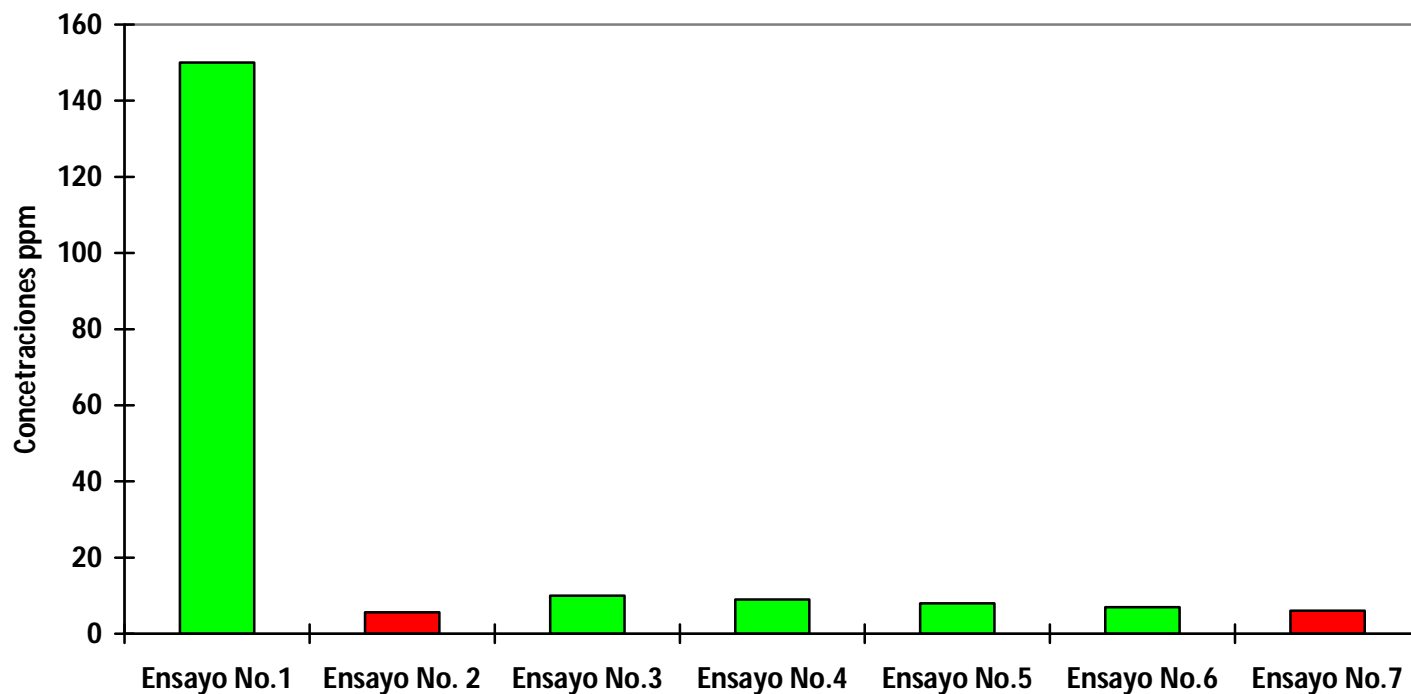
Grafico No. 1 – Relación Concentración de Nisina por ppm Vs. \$ / Lts

La grafica muestra el efecto de la adición de nisina en el costo del producto, la primera concentración de 150ppm representa un costo de 118.2 pesos por litro.

En la determinación de la dosis óptima es muy importante efectuar las consideraciones de costo.

Una adición de 7ppm que es considerada la dosis óptima su costo es de 5 pesos por litro.

PRESENCIA DE MICROORGANISMOS FRENTE A LA ADICIÓN DE NISINA



Los resultados mostraron que los ensayos 2 y 7 la dosis de Nisina no fue efectiva por motivo que sus análisis microbiológicos presentaron carga microbiana alta.

Grafico No. 2 – Efectividad de la Nisina en cada ensayo realizado.

CONCLUSIONES

Mediante los ensayos realizados se pudo determinar que bajo condiciones del procesamiento UHT es posible controlar la supervivencia y posterior desarrollo de los microorganismos utilizando Nisina.

La dosis óptima de Nisina por razones de costo y de efectividad fue de 7ppm, en las pruebas bajo las condiciones evaluadas.

A ésta dosis se garantiza que no afecta de ninguna manera el organismo humano.

El uso de Nisina en el proceso UHT genera una segunda barrera de protección adicional al empaque, pudiendo así dar mayor garantía de inocuidad en condiciones difíciles de transporte y almacenamiento.

La Nisina muestra propiedades termorresistentes al proceso UHT y mantiene su actividad antimicrobiana durante la vida útil del producto.

Debido al elevado costo de las preparaciones comerciales de nisina en este trabajo se hace mucho énfasis en encontrar la dosis óptima tanto técnica como económicamente apropiada.

RECOMENDACIONES

Este trabajo debido al tema propone la apertura de un campo de investigación en tecnología aplicada en lo que se refiere a la utilización de bacteriocinas en la conservación de alimentos. Recomiendo que se profundice en las posibles aplicaciones de la nisina y de otras bacteriocinas.

Otro concepto interesante que maneja este trabajo y que se sugiere como campo para continuar las investigaciones, es el de la protección de los alimentos por barreras. En nuestro medio debido a la baja fortaleza de la cadena de frío y a las dificultades económicas para la implementación de envases de alta tecnología es fundamental en términos de inocuidad proteger los alimentos suficientemente y aquí es donde se encuentra la oportunidad para la investigación.

También sugiero la profundización en temas de tratamiento UHT y envasado aséptico, procesos que están tomando relevancia en la industria y necesita profesionales capacitados y competentes para administrarlos.

Para el caso de los procesos UHT específicamente un campo de investigación se encuentra también en los estudios de muerte térmica y termorresistencia de algunas bacterias especialmente bacillus gram positivos que forman esporas.

Otro campo de trabajo en los procesos asépticos consiste en la profundización de los temas de limpieza y desinfección, es necesario evaluar diferentes sustancias, concentraciones, tiempos de circulación, costos y procesos de aplicación.

BIBLIOGRAFIA

Altena, K., Guder, A., Cramer, C., Bierbaum, G. (2000). Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2565-2571.

AMIOT, J. Ciencia y tecnología de la leche. Editorial Acribia S.A.

Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M., Nes, I.F. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1676-1682.

Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano

Bacteriocinas/bacterias fermentadoras acido lactico.htm

Baranova, I.P. y Egorov, N.S. 1981. Nisin adsorption on substrate solids. Antibiotiki, 26: 753-756

Barber, R.S, Braude, R. y Hirsch, A. 1952. Growth of pigs given skim milk soured with nisin-producing streptococci. Nature, 169:200

Barefoot, S.F y Klaenhammer, T.R. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 328-334

Buchman, G.W, Banerjee, S, Hansen, .N. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem, 263: 16260-16266.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E. (2001).
Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Sci. Technol. Int. 7: 281-305.

Chevalier, R.J, Fournaud, J. Levebre, E, Mocquot, G. 1957. Mise en evidence des streptocoques lactiques inhibiteus stimulants dans le lait et les fromages. Ann. Technol. Agric. 2: 117-137

Daeschel, M.A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43: 164-167.

Delves- Broughton, J 1990 nisin and its use as a food preservative. Food Technology

Davey, G.P y Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from Streptococcus cremoris 346. Appl. Environ. Microbiol, 41: 84-89

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technology, 44: 100-117.

Delves-Broughton, J. y Williams, G.C 1993. Nisin. En: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Macrae, R, Robinson, R.K y Sadler, M.J. (eds) pp. 3234-3240. Academic Press, Londres.

Davey, G.P y Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from Streptococcus cremoris 346. Appl. Environ. Microbiol, 41: 84-89

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44: 100-117

Delves-Broughton, J. y Williams, G.C. 1993. Nisin. En: *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Macrae, R, Robinson, R.K. y Sadler, M.J. (eds) pp. 3234-3240. Academic Press, Londres.

Delves-Broughton, J, Blackburn, P, Evans, R.E. y Hungenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. *Anton. Leeuwen*. 69: 193-202

Dodd, H.M, Horn, N, y Gasson, M.J. 1990. Analysis of the genetic determinant for the production of the antibiotic nisin. *J. Gen. Microbiol*, 136: 555-566

Egorov, N.S, Baranova, I.P y Kozlova, Y.I. 1979. Procedure for isolating nisin from *Streptococcus lactis*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, 15: 712-714.

Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Sorokine, O., van Dorsselaer, A., Bringel, F., Hubert, J.C.,

FAO/WHO Expert Committee on food Additives, 1969. Specifications for identity and purity of some antibiotics. 12th report. WHO Technical Reports Series, Nº 430.

Frazer, A.C, Sharott, M y Hickman, J.R. 1962. The biological effects of food additives. I nisin. *J. Sci. Food Agric*, 13: 32-42.

Fukase, K. Kitazawa, M, Sano, A, Shimbo, K, Fujita, H, Horimoto, S, Wakamiya, T. y Shiba T. 1988. Total synthesis of peptide antibiotic nisin. *Tetr. Lett*, 29: 795-798.
Gao, F.H. Abee, T. y Konings, W.N. 1991. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase-containing proteoliposomes. *Appl. Environ. Microbiol*, 57: 2164-2170.

Gould, G.W. (1996). Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. J. Food Protect. Supplement: 82-86.

Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. C.R.Soc. Biol. Fill. 93: 1040-1041.

Gross E. y Morell, J.L. 1971. The structure of nisin. J. Am. Chem. Soc., 93: 4634-4635.

Gudkov, A.V, Trofimova, T.I. Dolidze, G.G. Lynbimova, L.A, Sileva, M.N. y Blagushnia, R.F. 1993b. Comparison of nisin preparations of English, Polish and Soviet manufacture. Antibiotiki, 18: 162-165.

Hall, R.H. 1963. The production of nisin. Patente 916,351.

Hall, R.H. 1966. Nisin and food preservation. Proc. Biochem, 1: 461-464.

Hall, R H. 1966. Nisin and food preservation. Proc. Biochem.

Hara, S. Yakazu, K, Nakakawaji, K, Takenchi, T, Kobayashi, T, Sata, M. Imai, Z. y Shibuya, T. 1962 An investigation of toxicity of nisin with a particular reference to experimental studies of its oral administration and influences on digestive enzymes. Tokyo Med. Univ. J, 20: 175.

Harris, L.J. Fleming, H.P, Klaenhammer, H.R. 1992a. Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1477-1483.

Harris, L.J. Fleming, H.P, Klaenhammer, H.R. 1992b. Developments in nisin research. Food Res. Int. 25: 57-66.

Hasselmann, C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4381-4387.

Hawley, H.B. y Hall, R.H. 1957. The production of nisin. Patente 844, 782.

Heineman, B, y Williams, R. 1966. The inactivation of nisin by pancreatin. J. Dairy Sci, 49: 312-313.

Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol, 5: 208-221.

Heinemann, B, Voris, L y Stumbo, C.R 1965 use of nisin in processing food products food Technol.

Henning S, Metz, R. y Hammes, W.P 1986 Studies on the mode of action of nisin. Int J. Food Microbiol.

Hirsch, A. (1951). Growth and nisin production of strain of *Streptococcus lactis*. J. Gen. Microbiol. 5: 208-221.

Holck, A., Axelsson, L., Hühne, K., Kröckel, L. (1994). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb647. FEMS Microbiol. Lett. 115: 143-150.

Jarvis, B. y Mahoney, R.R. 1969. Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. J. Dairy Sci, 52: 1448-1450.

Joerger, C. y Klaenhammer, T.R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol, 167: 439-446.

Jones, L.W. 1974. Effect of butterfat on inhibition of *Staphylococcus aureus* by nisin. *Can. J. Microbiol.* 20: 1257-1260.

Jung, G. 1991. Lantibiotics: a survey. En *Nisin and Novel Lantibiotics*, Jung G. y Sahl, H.G. (ed), pp 1-34. ESCOM Publishers B. V, Leiden.

Jesús Muñoz-Rojas, *Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal No. 565-A, Cuernavaca Morelos.*

JUAN LUIS ARQUÉS OROBÓN MADRID, 2003. Tesis Doctoral: Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros sistemas inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. Facultad de veterinaria.

Kaletta, C, Entian, K.D, Kellner, R, Jung, G. Reis, M. 1989. Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Arch. Microbiol.* 152: 16-19.

Kordel, M. y Sahl, H.G. 1986. Susceptibility of a bacterial eukariotic and artificial membranas to the disruptive action of the cationic peptides Pep5 and nisin. *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 139-144.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86.

Kanatani, K., Oshimura, M., Sano, K. (1995). Isolation and characterization of acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1061-1067.

Kanddler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49: 209-224.

Lipinska, E. 1977. Nisin its applications. En Antibiotics and antibiosis in agriculture, Woodbine, M. (ed), pp 103-130. Butterworth, Londres.

Liu, W, y Hansen, J.N. 1990. Some chemical and phisical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol, 56: 2551-2558.

Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87: 149-164.

Mattick, A.T.R y Hirsch, A. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. Lancet 2: 5-7.

McClintock, M, Serres, L. Marzolf, J.J, Hirsch, A. y Mocquot G. 1952. Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le developpement des sporules anaerobies dans le fromage de Gruyere fondue. J. Dairy Res, 19: 187-193.

Nes, I.F. (1996). Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. J. Bacteriol. 178: 2232-2237.

PEREZ GAVILAN ESCALANTE, J. Bioquímica y Microbiología de la Leche. Editorial Limusa. México 1993.

Piard, J.C., Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by latic acid bacteria. 1. Oxigen metabolites and catabolism end-products. Lait 71: 525-541.

Piard, J.C. y Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait, 72: 113-142.

Quadri, L.E.N., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., Stiles, M.E. (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. J. Biol. Chem. 269: 12204-12211.

Ray, B. 1992. The need for food biopreservation. En Food biopreservatives of Microbial Origin, Ray, B. y Daeschel, M. (eds), pp. 1-23. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida.

Rodriguez, J.M, Cintas, L.M. Casaus, Suarez, A. y Hernandez, P.E. 1995. PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin-producing lactobacilli from meat. Appl. Environ. Microbiol, 61: 2802-2805.

Requena, T., Peláez, C. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 35: 19-44.
Rogers, L.A. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16: 321-325.

Ronk, R. (1988). Nisin preparation; affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. Fed. Regist. 53: 11247-11251.

Sahl, H.-G., Bierbaum, G. (1998). Lanthibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 52: 41-79.

Somers, E.B. y Taylor, S.L. 1987. Antobotulinal effectiveness of nisin in pasteurised cheese spreads. J. Food. Prot. 50: 842-848.

Stevens, K.A, Sheldon, B.W, Klapes, N.A, y Klaenhamer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol, 57: 3613-3615.

Stevens, K.A, Sheldon, B.W, Klapes, N.A, y Klaenhamer, T.R. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. J. Food Prot, 55: 763-766.

Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. Anton. Leeuwenhoek Int. J. Gen. M. 70: 331-345.

SUAREZ GEA, Ana María. Tesis Doctoral: Producción de anticuerpos frente a la Nisina A: Estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos. Universidad Complutense de Madrid – Facultad de Veterinaria.

Uhlman, L. Schillinger, U. Rupnow, J.R. y Holzapfel, W.H. 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. Int. J. Food Microbiol. 16: 141-151.

Vandenbergh, P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microb. Rev. 12: 221-238.

Van Belkum, M.J., Hayema, B.J., Jeeninga, R.E., Kok, J., Venema, G. (1991). Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. Appl. Environ. Microbiol. 57: 492-498.

Van Belkum, M.J., Kok, J., Venema, G. (1992). Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of *lcnB*, a third bacteriocin determinant from the lactococcal bacteriocin plasmid p9B4-6. Appl. Environ. Microbiol. 58: 572-577.

Venema, K., Dost., M.H.R., Beum, P.A.H., Haandrikman, A.J., Venema, G., Kok, J. (1996a). The genes for secretion and maturation of lactococcins are located on the chromosome of *Lactococcus lactis* IL 1403. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1689-1692.

Venema, K., Dost, M.H.R., Venema, G., Kok, J. (1996b). Mutational analysis and chemical modification of Cys24 of lactococcin B, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis*. Microbiology 142: 2825-2830.

WHO Expert Committee on Biological Standardization. 1969. Twenty-second report, WHO Technical Report Series N° 444.

WWW. Monografías.com/trabajo6/lacte/lacte.shtml

Yang, R., Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11: 281-291.

ANEXOS

Anexo No. 1
ASPECTOS LEGALES

MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL

DECRETO NÚMERO 616 DE 2006

CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE CRUDA. La leche cruda de animales bovinos debe cumplir con las siguientes características:

Características de la leche cruda

Parámetro/Unidad	Leche cruda	
Grasa % m / v mínimo	3.00	
Extracto seco total % m / m mínimo	11.30	
Extracto seco desengrasado % m / m mínimo	8.30	
	Min.	Max.
Densidad 15/15°C g/ml	1.030	1.033
índice Lactométrico	8.40	
Acidez expresado como ácido láctico %m/v	0.13	0.17
índice °C crioscópico °H	-0.530	-0.510
	-0.550	-0.530

CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE LA LECHE: La leche de los animales bovinos debe cumplir con las siguientes características fisicoquímicas

Características fisicoquímicas de la leche entera								
Parámetro/Unidad	Pasteurizada		Ultrapasteurizada		UAT(UHT)		Esterilizada	
Grasa % m/v mínimo	3.0		3.0		3.0		3.0	
Extracto seco total % m/m mínimo	11.30		11.20		11.20		11.20	
Extracto seco desengrasado % m/m mínimo	8.30		8.20		8.20		8.20	
Peroxidasa	Positiva		Negativa		Negativa		Negativa	
Fosfatasa	Negativa		Negativa		Negativa		Negativa	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.
Densidad 15/15°C g/ml	1.0300	1.0330	1.0295	1.0330	1.0295	1.0330	1.0295	1.0330
Acidez expresado como ácido láctico %m/v	0.13	0.17	0.13	0.17	0.13	0.17	0.13	0.17
índice °C	-0.530	-0.510	-0.540	-0.510	-0.540	-0.510	-0.530	-0.510
Crioscopico °H °H	-0.550	-0.530	-0.560	-0.530	-0.560	-0.530	-0.550	-0.530

REQUISITOS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE LÍQUIDA: La leche líquida debe cumplir con los siguientes requisitos microbiológicos:

Características microbiológicas de la leche ultrapasteurizada

índices permisibles	n	m	M	c
Rto. Microorganismos mesófilos ufc / mi	3	1.000	10.000	1
Rto. Coliformes ufc / mi	3	Menor de 1	-	0
Rto. Coliformes fecales ufc / mi	3	Menor de 1	-	0
Rto. Esporas anaerobias ufc / mi	3	Menor de 1	-	0
Rto. Esporas aeróbicas ufc /mi	3	Menor de 1	-	0

TOMA DE MUESTRA

Muestra (Muestra Representativa)

Es una muestra en la que se mantienen las características del lote del que procede. En concreto, es el caso de una muestra aleatoria simple, en la que todos los elementos o porciones del lote tienen la misma probabilidad de integrar la muestra.

Muestreo: Este procedimiento debe estar estandarizado de acuerdo a los lineamientos estipulados en la norma ISO 707-97 y seguir un modelo estadístico determinado, relacionando el número o tamaño de las muestras tomadas, con el tamaño total del lote a muestrear.

Muestras primarias: Es la 'porción de producto' extraída de un lote, que constituirá normalmente un elemento (si se ha tomado de un lote de productos preenvasados) o una porción de muestreo (si se ha extraído de un lote a granel). Durante la toma de muestras primarias (elementos o porciones de muestreo) y en todos los procedimientos subsiguientes habrán de tomarse precauciones a fin de mantener la integridad de la muestra.

Muestra compuesta

Cuando el plan de muestreo lo requiera, se obtendrá una **muestra compuesta** combinando con cautela las muestras primarias (los elementos) de un lote de productos *preenvasados*, o las muestras primarias (las porciones de muestreo) de un lote *a granel* (no preenvasado). En términos generales la norma ISO 7071997, contempla los siguientes requisitos:

- Personal en buen estado de salud, capacitado en el procedimiento de toma de muestra y autorizado para la ejecución del mismo.
- Esquema de identificación de la muestra el cual debe contener como mínimo un número o código único de identificación y el responsable del procedimiento. Adicionalmente y de acuerdo a los requerimientos de información, pueden puntualizarse otros aspectos tales como volumen de muestra, unidad, lote, condiciones, almacenamiento y propósito del muestreo.
- Número de muestras: como mínimo debe tomarse la muestra por duplicado, aunque es prudente tomar una tercera, para en un momento dado, dirimir conflicto de intereses.

TECNICAS ANALITICAS

RECuento TOTAL DE BACTERIAS EN LECHE.

Objeto.

Esta técnica describe el método de Recuento en Placa (SPC), para determinar el número de microorganismos aerobios mesófilos en leche.

Principio.

Es el método utilizado para la determinación del número de unidades formadoras de colonia (UFC) o células viables en leche.

Alcance.

Este procedimiento aplicará a las personas responsables que para ese fin tiene el laboratorio participante.

Definición.

Es el indicador del grado de contaminación microbiológica de la leche que permite tener información sobre su vida útil.

Equipos y Materiales.

1. Cabina de flujo laminar o cuarto estéril.
2. Incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 2$
3. Baño de agua o incubadora de 45 a 50°C.
4. Contador de colonias.

5. Frascos de dilución aforados a 99 ml.
6. Cajas de Petri estériles.
7. Tubos de ensayo tapa rosca de 20 x 180 mm.
8. Pipetas volumétricas tipo A de 1 ml, 10 ml y 11 ml estériles.
9. Gradillas.
10. Agar Plate Count (Agar peptona de caseína glucosa extracto de levadura)
11. Nevera para mantener las muestras entre 0 y 4°C.

Observación: Usar material de vidrio químicamente limpio y esterilizado. No usar cloro ni otras sustancias químicas como agente bactericida con la vidriería.

Reactivos.

Agua peptonada al 0.1% estéril.

Preparación de la muestra.

Elaborar una suspensión homogénea de leche conservada a 4° que permita la preparación de las diluciones que serán utilizadas en los métodos de recuento. Antes de abrir el recipiente que contiene la muestra quitar toda sustancia que pueda contaminarla.

Opcionalmente, limpiar el recipiente con una toalla o gasa estéril saturada con Alcohol etílico 96%

Procedimiento.

Preparar una dilución 10-1 con una pipeta estéril, transfiera 11ml de la muestra a un frasco que contenga 99 ml de agua peptonada al 0.1%. Agitar vigorosamente el frasco.

Preparar una dilución 10-2 transfiriendo un ml de la dilución 10-1 a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada al 0.1%. Agitar cuidadosamente.

Preparar una dilución 10-3 transfiriendo un ml de la dilución 10-2 a un tubo que contenga 9 ml de agua peptonada al 0.1%. Agitar cuidadosamente.

Repetir estos pasos hasta obtener el número de diluciones necesarias según el criterio establecido para cada una de las muestras. Siempre se deben sembrar un mínimo de 3 diluciones consecutivas.

Transferir por duplicado alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones consecutivas en caja de Petri estériles.

Verter en las cajas de Petri, 15 ml de agar Plate Count fundido y mantenido a 45°C Mezclar el inóculo con el medio de cultivo fundido. No debe transcurrir más de 20 minutos entre la realización de las diluciones y el vertido del medio. La manera mas indicada de mezclar el inóculo con el medio es la siguiente:

Mover la caja de arriba hacia abajo 5 veces.

Rotar la caja 5 veces en el sentido de las agujas del reloj. Mover la caja 5 veces haciendo ángulo recto sobre el movimiento. Rotar la caja 5 veces en el sentido contrario de las agujas del reloj. Hacer control de esterilidad del medio de cultivo incubando una caja que contenga agar Plate Count.

Hacer control de esterilidad del agua peptonada al 0.1% incubando una caja que contenga 1 ml de agua peptonada y agar Plate Count.

Una vez solidificado el medio de cultivo invertir las cajas e incubarlas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

Cálculos, presentación e Interpretación de resultados.

Seleccionar las dos cajas correspondientes a la misma dilución que presenten entre 30 y 300 colonias, contar las de cada caja, hallar el promedio y multiplicar por el factor de dilución.

Se reportan como UFC/ml. Si las cajas de las diluciones consecutivas tienen recuentos menores de 30 y mayores de 300 colonias se deben contar las 4 cajas, calcular el recuento para cada una de las diluciones y sacar el promedio entre las dos. Si no hay colonias en las cajas correspondientes a la dilución de mayor concentración, informar el recuento como menor de 1, multiplicado por el factor de dilución mas concentrada. En el caso de que dos diluciones consecutivas estén en el rango de 30 a 300 colonias, se hace el recuento para cada una de las diluciones y se reporta el promedio de los dos valores obtenidos, a menos que el recuento mayor contenga dos veces al menor, en este caso se reporta el recuento menor.

Para contar cajas que presenten más de 300 colonias, se tomarán los duplicados correspondientes a la dilución más elevada en secciones radiales de 2, 4 u 8, se contarán las colonias de una sección y se multiplica el resultado por el factor correspondiente (2,4 u 8). Se obtiene el promedio entre los duplicados y se multiplica por el factor de dilución de la caja para el informe. Si el anterior procedimiento no es posible se debe informar: Mayor de 300 colonias multiplicadas por el factor de la dilución más elevada.

DETERMINACION DEL TIEMPO DE REDUCCION DEL AZUL DE METILENO “TRAM” EN LECHE.

Objeto.

Esta técnica describe el método guía de referencia para determinar TRAM en leche.

Principio.

Es un método que se basa en la correlación existente entre el tiempo requerido para decolorar el Azul de Metileno y la carga bacteriana de la muestra.

Alcance.

Este procedimiento aplicará a las personas responsables que para ese fin tiene el laboratorio participante.

Equipos y Materiales.

- Toma muestra o Pipeta volumétrica tipo A de 10 ml.
- Pipeta volumétrica tipo A o pipeteador automático de 1 ml.
- Tubos tapa rosca de 150mm de largo por 15-18 mm de diámetro interior (o similar).
- Gradillas.

- Baño de María con control de temperatura por termostato para mantener la muestra a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un volumen de agua suficiente para que las muestras alcancen una temperatura mínima de 35°C antes de 10 minutos de haber sido colocados dentro de él. La altura del nivel del agua debe ser ligeramente por encima del nivel del contenido de los tubos debidamente tapados.
- Frascos de vidrio ámbar con tapa rosca de 500 y 100 ml.
- Reloj de laboratorio con alarma.
- Nevera para mantener las muestras entre 0 a 4°C .
- Marcador Indeleble.
- Observación: Usar material de vidrio químicamente limpio y esterilizado. No usar cloro ni otras sustancias químicas como agente bactericida para el material de vidrio.

Reactivos.

- Azul de metileno Grado reactivo ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) C.I. No.52015.
- Solución Colorante Madre.
- Colocar en un frasco estéril de color ámbar 500 ml de agua destilada estéril, agregar 0,275g de Azul de metileno pesado con exactitud, agitar, disolver completamente, enfriar y conservar en refrigeración máximo una semana.

- Solución de trabajo.
- En un frasco ámbar que contenga 90 ml de agua destilada estéril, agregar 10ml de solución madre. Preparar esta solución diariamente.

Preparación de la muestra.

Antes de tomar los 10 ml de la muestra, mezcle por inversión rápidamente 25 veces y limpie el recipiente con una toalla o gasa estéril saturada con Alcohol etílico 96°

Proceda a abrir el recipiente. El intervalo entre la agitación y la toma de la muestra no debe ser mayor de 3 minutos.

Para no comenzar las pruebas a intervalos irregulares, conservar los tubos que contienen las muestras de 0 a 4 °C, hasta que estas puedan ser examinadas de manera conjunta.

Procedimiento.

Coloque con la ayuda de una pipeta estéril o toma muestra 10 ml de leche en un tubo tapa rosca 15 x 150 estéril. Identifíquelo con marcador resistente a la humedad.

Con una pipeta estéril, transfiera a cada tubo 1 ml de la solución de trabajo inmediatamente después de colocar en el tubo 10 ml. de la muestra de leche, evitando la exposición prolongada a la luz, especialmente a la directa del sol. Determinar la posición de los tubos tan pronto como agregue el reactivo elaborando un cuadro para cada gradilla o adoptando otro procedimiento inequívoco. Tapar los tubos sin apretar y colocarlos en la nevera. Cuando todas

las muestras estén listas para incubación elevar la temperatura de los tubos a 37°C durante 10 minutos (controlados por reloj) y aflojar ligeramente las tapas. Determinar la temperatura de las muestras colocando un termómetro en un tubo control que contenga 10ml de leche, el cual debe ser tratado de la misma manera que las muestras.

Con el propósito de distribuir la crema, cuando la temperatura alcance los 37°C, apretar los tapones, invertir lentamente cada gradilla de tubos 3 veces y anotar esta hora como la del comienzo de la incubación hora 0. Nota: No reemplazar la inversión por la agitación.

Resultados.

Durante la incubación observar los cambios de color de la siguiente manera:

Apretar las tapas, invertir la muestra 3 veces, aflojar las tapas. Si una o más de las muestras se decolora después de una incubación de 30 minutos se informa como TRAM, (Tiempo de Reducción del Azul de Metileno): 30 minutos. Después de esta lectura inicial, efectuar las lecturas siguientes cada hora.

Anotar las lecturas en horas completas entre la inversión inicial triple de los tubos y las lecturas efectuadas al notarse la decoloración. Por ejemplo, si la decoloración se observa entre 0.5 a 1.5 horas, anotar el resultado como TRAM = 1 hora; si ocurre entre 1.5 y 2.5 horas se informará TRAM = 2 horas y así sucesivamente. Se debe informar hasta las 8 horas de reacción; si continúa la reacción informar TRAM mayor de 8 horas.

Inicialmente, después de cada lectura retirar las muestras decoloradas y anotar los resultados; invertir lenta y completamente los tubos restantes, para evitar la separación de la crema y la consiguiente distribución irregular de color azul que se puede observar al final del tiempo de cada lectura.

Procedimiento:

- a) Prueba con inoculación de un microorganismo esporulado termorresistente *Bacillus* spp y el proceso normal de la leche UHT. Aquí se determinara si existe crecimiento del microorganismo posterior al tratamiento térmico.
- b) Si es positiva la prueba A la B se hace en las mismas condiciones pero dosificando nisina a 150 ppm la cual es una dosis que garantiza la inactivación de los microorganismos esporulados. Con esta prueba se verificara el efecto de la nisina sobre la supervivencia del *Bacillus* spp.
- c) Si la prueba B es negativa, es decir si no hay crecimiento posterior del *Bacillus* spp se procederá a repetir ensayos con el procedimiento B pero reduciendo la dosis de nisina en cada uno de ellos, hasta encontrar la proporción optima.
- d) De cada uno de estos ensayos se hará seguimiento de la supervivencia del *Bacillus* spp durante toda la vida útil esperada del producto.